



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THIAGO FERREIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO PELA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA 3.0T DO REMODELAMENTO
CARDÍACO SECUNDÁRIO AO USO DE QUIMIOTERÁPICOS DERIVADOS DA
ANTRACICLINA

*DOXORUBICIN-ASSOCIATED CARDIAC TISSUE REMODELING STUDY WITH 3.0T
MAGNETIC RESONANCE*

CAMPINAS

2018

THIAGO FERREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO PELA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA 3.0T DO REMODELAMENTO
CARDÍACO SECUNDÁRIO AO USO DE QUIMIOTERÁPICOS DERIVADOS DA
ANTRACICLINA**

***DOXORUBICIN-ASSOCIATED CARDIAC TISSUE REMODELING STUDY WITH 3.0T
MAGNETIC RESONANCE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, Área de concentração – Pesquisa Clínica.

Thesis presented to Post Graduate Program of Medical Sciences, School of Medical Sciences, State University of Campinas – UNICAMP for obtaining the Master in Medical Sciences grade. Concentration Area – Clinical Research.

ORIENTADOR: PROF. DR. OTÁVIO RIZZI COELHO FILHO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO THIAGO FERREIRA DE SOUZA, E ORIENTADO PELO PROF. DR. OTÁVIO RIZZI COELHO FILHO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011/10481-0; CNPq, 303366/2015-0

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6498-1758>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

So89a Souza, Thiago Ferreira de, 1983-
Avaliação pela ressonância magnética 3.0T do remodelamento cardíaco secundário ao uso de quimioterápicos derivados da antraciclina / Thiago Ferreira de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Otávio Rizzi Coelho Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cardiotoxicidade. 2. Gadolínio. 3. Hipertrofia. 4. Antraciclinas. 5. Ressonância magnética. 6. Fibrose. I. Coelho-Filho, Otávio Rizzi, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Doxorubicin-associated cardiac tissue remodeling study with 3.0T magnetic resonance

Palavras-chave em inglês:

Cardiotoxicity
Gadolinium
Hypertrophy
Anthracyclines
Magnetic resonance
Fibrosis

Área de concentração: Pesquisa Clínica

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Otávio Rizzi Coelho Filho [Orientador]
Celso Dario Ramos
Gilberto Szarf

Data de defesa: 17-01-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

THIAGO FERREIRA DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. OTÁVIO RIZZI COELHO FILHO

MEMBROS:

1. PROF. DR. OTÁVIO RIZZI COELHO FILHO

2. PROF. DR. CELSO DARIO RAMOS

3. PROF. DR. GILBERTO SZARF

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

DATA DA DEFESA: 17/01/2018

Dedico este trabalho à minha esposa, Ana Beatriz, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, aos meus filhos Lucas e Felipe que, mesmo sem saber, iluminaram os meus pensamentos e aos meus pais Paulo e Ana Lúcia, por todo o amor e os exemplos que me deram, me levando a buscar mais conhecimentos.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente ao professor Otávio Rizzi Coelho Filho, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Agradeço também à Universidade Estadual de Campinas, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo suporte financeiro.

Agradeço principalmente às pacientes que, mesmo em um momento de dificuldade, aceitaram participar deste trabalho.

RESUMO

Introdução: O diagnóstico e tratamento das neoplasias apresenta constante avanço com significativa redução da morbidade e mortalidade. Muitas drogas utilizadas apresentam efeitos adversos no sistema cardiovascular, podendo induzir disfunção ventricular esquerda e insuficiência cardíaca. As modalidades de imagem clinicamente disponíveis não avaliam quantitativamente os principais marcadores do remodelamento cardíaco associado com o uso das antraciclina, que são a expansão do volume extracelular (VEC) e a fibrose intersticial. Mesmo técnicas da ressonância magnética cardíaca (RMC) disponíveis atualmente para uso clínico não avaliam a fibrose intersticial difusa associada ao uso de antraciclina. Frente ao exposto, existe uma necessidade de melhorar a detecção e caracterização não-invasiva da cardiotoxicidade induzida pelas antraciclina. Estudos seriados de RMC em modelos animais demonstram que as antraciclina estão associadas a aumento da fibrose intersticial com subsequente redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Até o momento não há dados clínicos disponíveis demonstrando efeito semelhante. **Objetivo:** Realizar RMC seriadas para avaliar como as antraciclina estão associadas com aumento precoce da fibrose miocárdica. **Métodos:** Foram recrutadas 27 mulheres com câncer de mama (idade média: 52 ± 9 anos, IMC: $27 \pm 4 \text{ kg/m}^2$) sem insuficiência cardíaca estabelecida, as quais foram submetidas a exames de RMC antes (basal) e até 3 vezes após a quimioterapia (Momento1: ≈ 3 meses, Momento2: ≈ 6 meses, Momento3: ≈ 9 meses e Momento4: ≈ 18 meses). As medidas de interesse foram: a FEVE, o edema miocárdico, o VEC, a massa de cardiomiócitos (Massa do VE $\times (1 - \text{VEC})$), o tamanho da célula (tempo de vida intracelular da água/ τ), a quantificação de fibrose utilizando mapa de T1 antes e após a administração de gadolínio e o realce tardio. Biomarcadores séricos foram colhidos antes e 72 horas após cada ciclo de doxorrubicina. **Resultados:** Todas as pacientes apresentavam valores basais normais da FEVE ($69.4 \pm 3.6\%$) e da massa indexada do VE ($51.4 \pm 8.0 \text{ g/m}^2$), um VEC de 0.32 ± 0.038 , e ausência de realce tardio. Após administração de 240 mg/m^2 de doxorrubicina (DOX) houve redução da FEVE [8% no Momento1, 13% no Momento2, 16% no Momento3 e 12% no Momento4, ($P < 0.001$)] e da massa indexada do VE [$6.3 \text{ g/m}^2 \pm 1.4$ no Momento1, 7.9 ± 1.3 no Momento2, 10.97 ± 1.44 no Momento3, e 19.0 ± 1.5 no Momento4, ($P < 0.001$)]. O VEC aumentou e o tamanho da célula reduziu pós-DOX. VEC apresentou forte associação com τ ($P < 0.001$), independente da idade e da massa indexada do VE. Houve aumento do edema miocárdico no Momento2 ($P < 0.001$) pós-DOX, com posterior normalização. A massa indexada do VE reduziu $30.0 \pm 11.9\%$ entre os valores basais e o Momento4. A massa

indexada teve forte associação com *tau* ($b=4.1\pm1.5\text{g/m}^2$ cada 0.1ms de acréscimo de *tau*; $P=0.007$), porém não com VEC ($P=0.164$). O tamanho basal da célula foi preditor de disfunção sistólica tardia: pacientes com tamanho da célula acima da mediana tiveram FEVE $9.3\pm0.036\%$ menor no Momento3 ($P=0.013$), e $8.5\pm0.035\%$ menor no Momento4 ($P=0.0193$).

Conclusão: A terapia com DOX está associada ao declínio significativo da FEVE e da massa do VE. A perda de massa do VE com aumento do VEC pôde ser atribuído, em grande parte, à atrofia dos cardiomiócitos. O tamanho basal dos cardiomiócitos pode prever disfunção do VE após o uso de DOX.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Mapa T1; Remodelamento ventricular; Antraciclina; Fibrose; Ressonância magnética.

ABSTRACT

Introduction: Neoplastic diagnosis and treatment improved lately with a significant reduction in morbidity and mortality. Many drugs may affect the cardiovascular system and induce left ventricular dysfunction and heart failure. The current imaging modalities are not able to quantify the expansion of extracellular volume (ECV) and interstitial fibrosis, main causes of cardiac remodeling associated with anthracyclines. Even cardiac magnetic resonance (CMR) techniques clinically available can not evaluate diffuse interstitial fibrosis associated with anthracycline derivatives. There is a need for improved detection and characterization of anthracycline-induced cardiotoxicity (AIC). Serial cardiac magnetic resonance imaging (CMR) in animals has shown that AIC is associated with an increase in interstitial myocardial fibrosis prior to a reduction in left ventricular ejection fraction (LVEF). There are no parallel clinical data. **Objective:** Therefore, the aim of this study was to use serial CMR to test whether anthracyclines were associated with an early increase in myocardial fibrosis.

Methods: Twenty-seven women with breast cancer (BC) (mean-age 52 ± 9 years, BMI $27 \pm 4 \text{ kg/m}^2$), without established heart-failure, were recruited and underwent CMR imaging prior to (baseline) and 3 times after anthracyclines (Time 1: ≈ 3 months, Time 2: ≈ 6 months, Time 3: ≈ 9 months and Time 4: ≈ 18 months). CMR variables of interest were LVEF-function, myocardial edema, the extracellular volume (ECV), cardiomyocytes mass (LV mass $\times (1 - \text{ECV})$), cell size (intra-cellular lifetime of water/ τ) and focal fibrosis using T1 mapping pre- and post-gadolinium, and LGE imaging. Serum biomarkers were also obtained before and 72 hours after each DOX-cycle.

Results: All subjects had normal baseline LVEF ($69.4 \pm 3.6\%$) and LV Mass index ($51.4 \pm 8.0 \text{ g/m}^2$), an ECV of 0.32 ± 0.038 , and no LGE. After DOX (240 mg/m^2), both the LVEF [by 8% at Time1, 13% at Time 2, 16% at time 3 and 12% at Time 4, ($P < 0.001$)] and LV Mass index [by $6.3 \pm 1.4 \text{ g/m}^2$ at Time 1, 7.9 ± 1.3 at Time 2, 10.97 ± 1.44 at Time 3, and 19.0 ± 1.5 at Time 4, ($P < 0.001$)] decreased. ECV increased and cell size decreased after anthracyclines. ECV was strongly associated with τ ($P < 0.001$), independent of age and LV mass index. There was an increase in myocardial edema in the Time 2 period after DOX initiation ($P < 0.001$), with later normalization. LV mass index dropped by $30.0 \pm 11.9\%$ between baseline and the Time 4 period post-DOX. Cardiac mass index was strongly associated with τ ($b = 4.1 \pm 1.5 \text{ g/m}^2$ per 0.1 ms increase of τ ; $P = 0.007$), but not with ECV ($P = 0.164$). Baseline cell size predicted late systolic dysfunction: subjects with a cell size of $>$ the median value at baseline had a $9.3 \pm 0.036\%$ lower LVEF at Time 3 ($P = 0.013$), and a

8.5±0.035 % lower LVEF at Time 4 after DOX initiation (P=0.0193).

Conclusion: DOX-therapy was associated with a significant decline in both LVEF and LV Mass. The loss of LV Mass and increase of ECV could be largely attributed to cardiomyocyte atrophy. Also cardiomyocyte size at baseline possibly predicts LV dysfunction after DOX therapy.

Key Words: Cardiotoxicity; T1 mapping; Ventricular remodeling; Anthracycline; Fibrosis; Magnetic resonance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIA	- Cardiotoxicidade induzida por antraciclinas
CK	- Creatina quinase
CKMB	- Creatina quinase banda miocárdica
CM	- Câncer de mama
cTnT	- Troponina cardíaca T
DOX	- Doxorrubicina
FEVE	- Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FVEC	- Fração do volume da matriz extracelular
HER2	- Fator de crescimento epidermal humano 2
IC	- Insuficiência cardíaca
Kg	- Quilograma
MC	- Massa dos cardiomiócitos
MLM	- Modelo linear de efeitos mistos
mmol	- Milimol
λ_{GD}	- Coeficiente de partição do gadolínio
PCR	- Proteína C-reativa
RMC	- Ressonância magnética cardíaca
RT	- Realce tardio
SUS	- Sistema único de saúde
TFG	- Taxa de filtração glomerular
τ_{ic}	- Tempo de vida intracelular da água
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
VE	- Ventrículo esquerdo
VEC	- Volume extracelular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Cardiotoxicidade dos Derivados da Antraciclina.....	13
1.2. Ressonância Magnética Cardíaca.....	15
1.3. Fibrose Intersticial Difusa e Quantificação do T1 pela RMC.....	17
1.4. Quantificação da Medida do Coeficiente de Partição do Gadolínio.....	18
1.5. Tempo de Vida Intracelular da Água e o Tamanho do Cardiomiócito.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Sujeitos.....	22
3.2. Critérios de Inclusão.....	23
3.3. Critérios de Exclusão.....	23
3.4. Metodologia.....	24
3.4.1. Ressonância Magnética Cardíaca.....	24
3.4.2. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Preditores de Disfunção do Ventrículo Esquerdo após Antraciclina.....	32
4.2. ARTIGO SUBMETIDO: DOXORUBICIN-ASSOCIATED CARDIAC TISSUE REMODELING IN BREAST CANCER PATIENTS: A CARDIAC MAGNETIC RESONANCE COHORT STUDY.....	34
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Perspectiva Clínica.....	66
5.2. Limitações.....	67
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS.....	69
8. ANEXOS.....	75
ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.....	75
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cardiotoxicidade dos Derivados da Antraciclina

Nas últimas duas décadas, o diagnóstico e tratamento das doenças neoplásicas tem sofrido um constante avanço, com significativa redução da morbidade e mortalidade de diversos tipos de neoplasias¹. Esta melhora na sobrevida gerou um paradigma no cuidado com estes pacientes, com maior ênfase em minimizar as complicações de longo prazo relacionadas ao tratamento. A doença cardiovascular em pacientes com câncer pode ocorrer pela presença de fatores de risco combinados ou por efeito adverso da quimioterapia ou por uma combinação de ambos. Usualmente a estratégia de tratamento inclui a combinação de diferentes drogas quimioterápicas, sendo que muitas dessas drogas apresentam sérios efeitos adversos no sistema cardiovascular, podendo até induzir condições graves como a disfunção ventricular esquerda e até mesmo insuficiência cardíaca (IC) clinicamente manifesta. Diversos tipos diferentes de quimioterápicos se associaram com o desenvolvimento de toxicidade cardíaca²⁻⁵. As drogas derivadas da Antraciclina, entre estas a doxorubicina, daunorubicina, idarubicina e epirubicina, são os agentes mais comumente implicados com efeitos adversos irreversíveis ao sistema cardiovascular; levando inclusive ao desenvolvimento de cardiomiopatias graves e até mesmo a morte⁶. Com o uso de esquemas terapêuticos cada vez mais prolongados e agressivos, a toxicidade cardíaca emerge como um grande problema a ser resolvido.

Deve-se salientar que para avaliar os efeitos cardíacos da quimioterapia é necessário distinguir disfunção cardíaca de injúria cardíaca. A disfunção cardíaca relacionada à quimioterapia é definida como uma redução maior que 5% na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) para menos de 55%, associada a sintomas de insuficiência cardíaca, ou uma redução de 10% para menos de 55% em pacientes assintomáticos⁷. Entretanto há dados disponíveis que mostram que injúria cardíaca significativa pode ocorrer, sem alteração clara na FEVE⁸, e um excesso da importância na queda da FEVE que pode levar à falsa impressão de que não há injúria cardíaca⁹. De fato, a redução da FEVE representa um marcador de lesão avançada do miocárdio, para além do que o coração consegue compensar. Por conta disso, o uso do termo injúria cardíaca ou cardiotoxicidade tem sido mais adequado, englobando todos os graus de lesão e não se limitando aos efeitos macroscópicos.

Sabe-se que a incidência de toxicidade cardíaca está diretamente relacionada com a dose cumulativa de antraciclina administrada por superfície corpórea. Dados da literatura

estimam que até 50% dos pacientes tratados com antraciclina irão desenvolver algum grau de disfunção cardíaca¹⁰, porém que pode se manifestar somente vários anos após a quimioterapia¹¹. Um estudo retrospectivo¹² estimou que 5% dos pacientes que receberam doses cumulativas de até 400 mg/m² desenvolveram IC, enquanto que este número chegou a 26% com doses de 550 mm/m² e 48% em doses de 700mg/m². O risco aumenta em pacientes nos extremos de idade, quando associado a radioterapia, hipertensão arterial ou doença arterial coronariana prévia. O desenvolvimento recente de novas técnicas não-invasivas de monitoramento da fisiologia cardíaca propiciaram o reconhecimento subclínico da cardiotoxicidade, mostrando que o problema seria na realidade muito maior do que os estudos clínicos iniciais sugeriram, os quais em sua maioria apenas reportaram a incidência de IC clinicamente manifesta. Interessante destacar que o uso concomitante dos derivados da antraciclina com outras classes quimioterápicos como o trastuzumabe, um anticorpo monoclonal anti-fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), parece se associar com risco ainda mais aumentado de insuficiência cardíaca¹³⁻¹⁵. As antraciclina causam lesão do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias; modificação estrutural e funcional de miofibrilas; perda total ou parcial da matriz intercalada com placas de colágeno no interstício; modificação do acoplamento excitação-contração e do fluxo de cálcio; apoptose; alterações do metabolismo do ferro; e perda da capacidade de regeneração do músculo cardíaco e das células endoteliais coronarianas¹⁶⁻¹⁸. Apesar dos mecanismos moleculares de lesão ao cardiomiócito não estarem totalmente esclarecidos, acredita-se que as células cardíacas sejam danificadas pelo excesso de produção de radicais livres derivados do oxigênio, com consequente aumento do estresse oxidativo ao nível celular, causando peroxidação lipídica da membrana celular dos cardiomiócitos com vacuolização irreversível e subsequente processo de preenchimento por fibrose com aumento acentuado na matriz extracelular¹⁹. Estudos mecanísticos com a doxorubicina, um dos derivados da Antraciclina mais utilizados no Brasil e também padronizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), mostraram que o seu uso estaria também associado com a redução de antioxidantes endógenos circulantes responsáveis pelo *turn over* de radicais livres da corrente sanguínea^{17,20}.

O que tem ficado claro é que a detecção precoce da cardiotoxicidade, com instituição apropriada de terapia cardiovascular, melhora a sobrevida dos pacientes. Cardinale e colaboradores²¹ estudaram a resposta clínica ao tratamento de insuficiência cardíaca utilizando enalapril e carvedilol, quando tolerado, em pacientes com cardiotoxicidade induzida por antraciclina (CIA), e identificaram que o tempo entre o fim da quimioterapia e o início do tratamento foi o principal fator na melhora da FEVE. Os autores notaram que, ao

dobrar o tempo para iniciar a medicação, havia uma redução de quatro vezes na chance de recuperação completa da função cardíaca. Este estudo reforça a importância na identificação precoce da lesão cardíaca, a estreita janela de tempo para início de terapia efetiva e o potencial benefício de detectar a cardiotoxicidade que precede até mesmo a disfunção sistólica assintomática.

Até o presente momento todas as modalidades de imagem disponíveis, incluindo o ecocardiograma e a medicina nuclear, avaliam a morfologia e a função ventricular, sem abordarem quantitativamente o marcador mais importante do remodelamento cardíaco associado ao uso da antraciclina, que tudo indica ser a expansão do espaço extracelular e a fibrose intersticial. Outro ponto importante a ser levantado é o fato de que a disfunção ventricular esquerda parece ser um evento tardio no complexo processo da toxicidade cardíaca mediado pelos quimioterápicos. Dessa forma, métodos de imagem não-invasivos capazes de identificar alterações precoces ao nível celular, como é o caso da fibrose intersticial difusa, seriam de extrema valia não apenas para estratificar os pacientes que estariam sob risco elevado de desenvolvimento de IC, mas também para potencialmente direcionar estratégias de tratamento medicamentoso mais agressivas e precoces.

1.2. Ressonância Magnética Cardíaca

A técnica do realce tardio (RT) após injeção de gadolínio-DTPA pela ressonância magnética cardiovascular (RMC) se tornou o método de escolha para detecção de necrose e fibrose miocárdica com alta resolução^{22,23}. O realce tardio é baseado na identificação de áreas focais e densas de realce em relação às áreas normais do miocárdio. Em diversas condições clínicas, tais como na cardiopatia isquêmica, cardiopatia dilatada não isquêmica, cardiopatia diabética, cardiopatia hipertensiva e até mesmo na cardiopatia secundária ao uso quimioterápicos, a presença de fibrose foi comprovada como um marcador do remodelamento ventricular^{19,24-27}. Sabe-se que o RT pode estar ausente ou apenas oferecer uma quantificação parcial da extensão do acometimento miocárdico, sendo que isto é particularmente verdade nas condições em que a lesão cardíaca é difusa, como é o caso da CIA. A presença de fibrose intersticial é um fator de risco independente para morte súbita²⁸ e insuficiência cardíaca²⁹, sendo que até a presente data nenhum método de imagem não-invasivo, incluindo o RT pela RMC, consegue detectar a fibrose intersticial de forma precisa. Mais recentemente, o Dr. Jerosch-Herold descreveu uma técnica baseada na determinação da distribuição relativa do volume de gadolínio injetado e nas mudanças no T1 do miocárdio para quantificar o volume

extracelular do miocárdio como um marcador de fibrose e remodelamento. Como o tecido fibrótico é o principal constituinte do espaço intersticial, Jerosch-Herold introduziu o termo “índice de fibrose” se referindo a fração do volume da matriz extracelular (FVEC). Foi demonstrado que, através da medida do coeficiente de partição do gadolínio no miocárdio (λ_{GD}), era possível estimar precisamente a FVEC e determinar o “índice de fibrose” como um marcador objetivo de remodelamento cardíaco³⁰. O “índice de fibrose” é uma medida contínua e quantitativa do remodelamento extracelular, podendo ir desde o miocárdio normal, passando pelo miocárdio com fibrose intersticial, indo até fibrose difusa extensa com miocárdio não viável e cicatriz (Figura 1). O “índice de fibrose” é derivado do coeficiente de partição do gadolínio no miocárdio, corrigindo para concentração do gadolínio no sangue com a medida do hematócrito. Visto que o colágeno é o constituinte sólido predominante da FVEC, o valor do coeficiente de partição se correlacionou muito bem com o volume de colágeno pela biópsia cardíaca, como foi demonstrado por Flett e colaboradores³¹. Dessa forma o “índice de fibrose” parece ser um marcador extremamente sensível e potencialmente precoce, com possíveis aplicações em qualquer cardiomiopatia que envolva aumento da FVEC. Mais recentemente nosso grupo, utilizando dados retrospectivos, demonstrou o potencial de utilidade da quantificação da FVEC pela RMC em algumas condições clínicas, como na suspeita de doença cardíaca por depósito³² e também na cardiotoxicidade pelo uso de quimioterápicos derivados da antraciclina³³. Devido aos elevados custos e aos riscos inerentes de complicação da biópsia cardíaca, a determinação da FVEC parece ser uma alternativa muito interessante e não-invasiva para quantificação do grau de remodelamento cardíaco. Além disso, até o momento, a avaliação não-invasiva da doença cardíaca induzida por antraciclina se restringiu apenas a uma análise morfológica e funcional, sendo que não resta dúvidas que as alterações morfológicas e funcionais são eventos tardios e apenas refletem a manifestação de um complexo processo na perspectiva da piora da função ventricular.

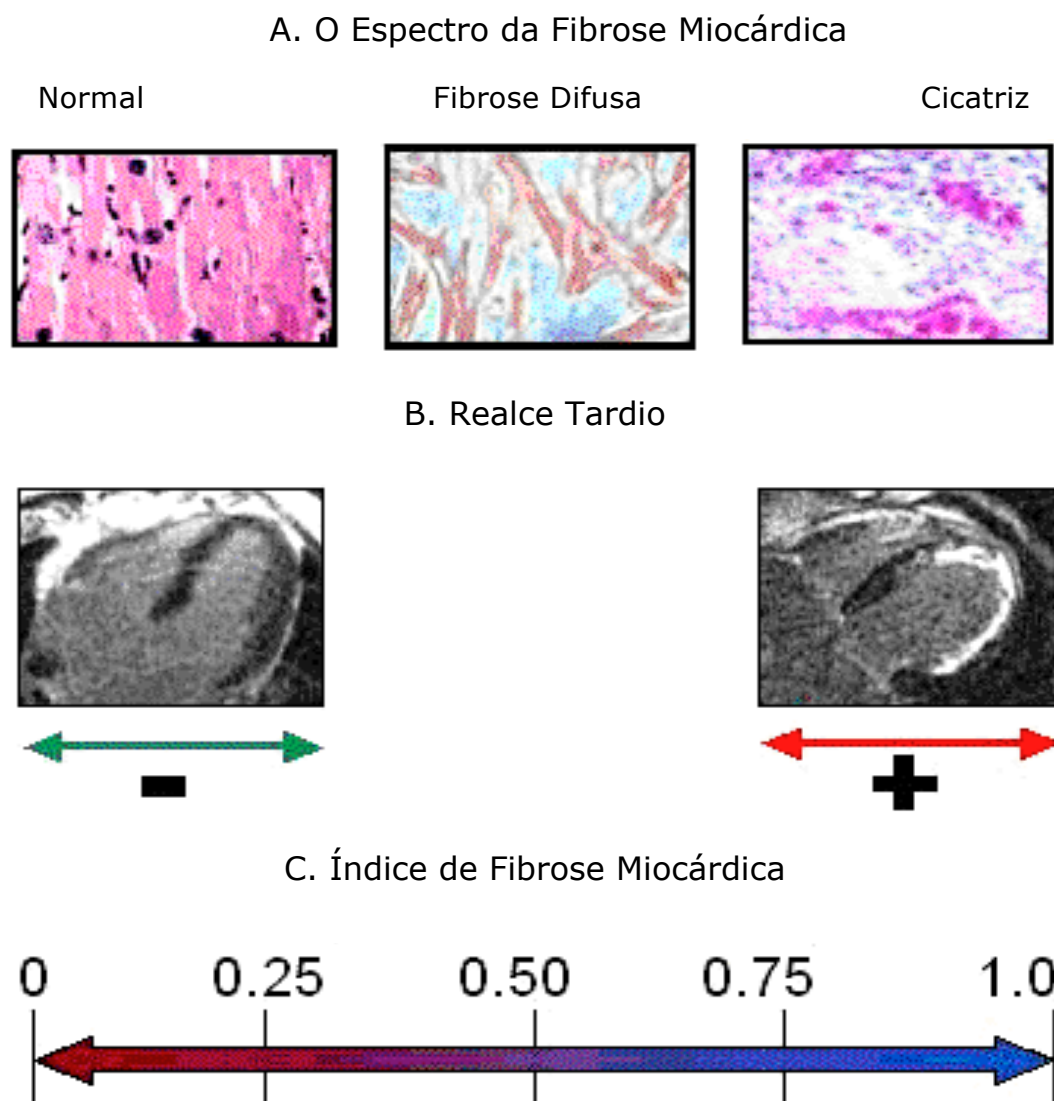


Figura 1: Espectro da fibrose miocárdica. O coeficiente de partição do gadolínio-DTPA(λ_{GD}), no miocárdio em combinação com o hematócrito sanguíneo fornece a medida continua da fração do volume extracelular, ou “índice de fibrose” (C). O realce tardio (B) é capaz de detectar apenas áreas com fibrose densa, enquanto que o “índice da fibrose” consegue identificar uma amplo espectro da fibrose miocárdica (A).

1.3. Fibrose Intersticial Difusa e Quantificação do T1 pela RMC

Existem diversas vantagens na quantificação do λ_{GD} sobre a simples medida do T1 após injeção de gadolínio. Ao invés de apenas refletir o volume extracelular, a quantificação do λ_{GD} depende também de vários outros fatores como: a taxa de difusão do contraste do sangue, a dosagem do contraste e o tempo em que as medidas são realizadas. Dessa forma como o λ_{GD} leva em consideração o “*arterial input*” do contraste, permitindo a

quantificação de propriedades do tecido cardíaco independentemente da dosagem do contraste, do tempo, do equilíbrio entre sangue-tecido, além de dados hemodinâmicos da pressão arterial e frequência cardíaca. Em outra publicação, a simples medição do T1 após a administração de gadolínio identificou claramente pacientes com insuficiência cardíaca quando comparados a controles sem doença cardíaca²⁸. Neste estudo os valores anormais de T1 apresentam correlação com a expansão da matriz extracelular. Os valores de T1 também apresentaram correlação com o grau de disfunção diastólica e com a quantidade de colágeno por biópsia miocárdica. Além disso foi demonstrado que esta associação se mantinha mesmo quando os autores ajustavam para idade, frequência cardíaca e índice cardíaco. Conforme discutido no editorial que acompanhou a publicação³⁴, esse método se mostrou muito promissor, sendo “a próxima fronteira para um melhor entendimento da disfunção miocárdica”. Flett *et al*³¹ mais recentemente usaram a abordagem semelhante a previamente descrita por Jerosch-Herold para a quantificação da FVEC, com exceção do fato de Flett ter utilizado infusão constante de contraste. O estudo publicado por Flett *et al* validou a quantificação da FVEC do miocárdio contra a medida do volume de colágeno obtido pela biópsia endomiocárdica, sendo que os autores reportaram um elevado grau de correlação entre essas duas medidas.

No presente estudo iremos realizar a aquisição das imagens antes e após a injeção da dose máxima cumulativa de gadolínio.

1.4. Quantificação da Medida do Coeficiente de Partição do Gadolínio

O coeficiente de partição para um traçador no miocárdio é definido como a razão da concentração do referido traçador no tecido e no sangue em equilíbrio. Em equilíbrio, a concentração de um contraste extracelular, como é o caso do gadolínio, no espaço intersticial deve ser igual à concentração desse contraste no sangue. Em termos de volumes específicos (volume normalizado pelo peso do tecido, expresso em ml/g) do interstício (V_{inters}) e do plasma (V_{plasma}), é possível expressar o coeficiente de partição para um traçador ou contraste extracelular como:

$$\lambda = (V_{inters} + V_{plasma}) / (1 - Hct)$$

Onde Hct é o hematócrito do sangue. Os contrastes utilizados em ressonância magnética tipicamente reduzem o T1. Dessa forma o coeficiente de partição do gadolínio no miocárdio pode ser calculado a partir da razão entre mudanças de R1 ($R1 = 1/T1$) no tecido sobre a mudança de R1 no sangue. Diversas estratégias já foram propostas para a medida do

coeficiente de partição do gadolínio no miocárdio pela RMC, sendo que a maioria desses estudos foram realizados em voluntários sem cardiopatia²⁷, ou em pacientes com cardiopatia isquêmica³⁵.

Os estudos iniciais in-vivo assumiram a necessidade de um longo período para obtenção de equilíbrio após administração de gadolínio entre o sangue e o tecido cardíaco^{27,36,37}. Apenas recentemente ficou comprovado ser possível a medida do coeficiente de partição do gadolínio no miocárdio após única administração de contraste paramagnético extracelular (0.2 mmol por peso em Kg), através da aquisição combinada de imagens ponderadas em T1, com mensuração das mudanças na intensidade de sinal cerca de 30 minutos após a injeção do contraste³⁵.

1.5. Tempo de Vida Intracelular da Água e o Tamanho do Cardiomiócito

Os cardiomiócitos são células alongadas, próximas da forma cilíndrica^{38,39}. O tempo de vida intracelular das moléculas de água (τ_{ic}) é definido como o tempo médio para as moléculas de água cruzarem as membranas celulares (Figura 2). Sabemos que moléculas de água podem atravessar livremente a membrana celular entre o espaço intersticial (extracelular) e o espaço intracelular, sendo que o tempo médio de vida da água intracelular é o tempo de difusão para atingir a membrana celular.

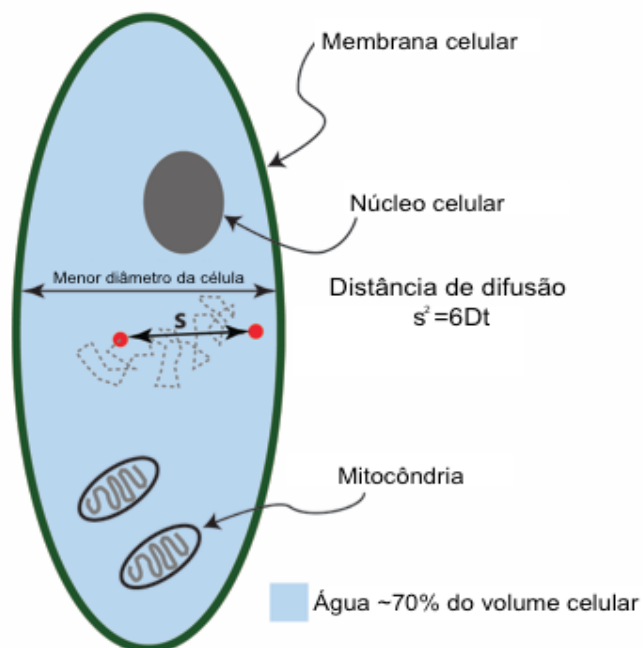


Figura 2: Tempo de vida intracelular das moléculas de água. O tempo de difusão (t) se relaciona com a distância de difusão (s) e o coeficiente de difusão intracelular do plasma (D).

A medida do τ_{ic} está diretamente relacionada ao tamanho e ao volume das células⁴⁰. Pela equação da difusão de Einstein⁴¹, temos que **S** é a distância de difusão, **D** é o coeficiente de difusão intracelular do plasma e **t** é o tempo de difusão:

$$S^2 = 6 D \times t \quad (2)$$

O τ_{ic} teoricamente muda linearmente com relação volume para superfície. Para uma célula alongada, quase cilíndrica, o τ_{ic} é em uma primeira aproximação o diâmetro menor da célula.

No miocárdio, a determinação do tempo T1 após a administração de um contraste extra celular como o gadolínio-DTPA pode ser usada para investigar o τ_{ic} ⁴⁰.

Estudos experimentais demonstraram que efeitos miocárdicos subclínicos da CIA incluíam expansão do espaço intersticial, interpretada como aumento dos níveis da fibrose intersticial, edema, e redução do tamanho do cardiomiócito⁴²⁻⁴⁴, todos sendo caracterizados efetivamente pela RMC.

Neste estudo, avaliamos CIA utilizando novos marcadores de remodelamento miocárdico pela RMC, incluindo o volume extracelular (VEC) – um marcador de fibrose intersticial – e o tempo de vida intracelular da água (τ_{ic}) – um marcador do tamanho do cardiomiócito.

Dessa forma, a hipótese desse estudo é que estes novos marcadores da RMC identificariam injúria miocárdica em pacientes com câncer de mama (CM) tratadas com antraciclinas⁸.

2. OBJETIVOS

i. Quantificar a fração do volume extracelular do miocárdio, através de um novo método oriundo da RMC, em pacientes submetidos a terapia com antraciclina.

ii. Correlacionar a medida dos novos métodos derivados da RMC com os valores de marcadores clássicos de inflamação e lesão miocárdica, no sentido de validar estas novas técnicas para seguir clinicamente pacientes em tratamento com antraciclina.

iii. Correlacionar estes novos métodos, assim como todas as outras variáveis derivadas da RMC, como RT, os volumes e massa ventricular, com os níveis de biomarcadores de insuficiência cardíaca.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (CAAE:0675.0.146.000-11), conforme consta no Anexo 1. A pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinki dos Princípios Éticos para Pesquisa Médica envolvendo Seres Humanos - 59ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial (2008). Todos os pacientes receberam informações sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Informado (Anexo 2). O presente estudo foi inscrito no sítio *Clinical Trials* sob o seguinte registro: DOX-0675014600011.

Foram incluídas no estudo 27 pacientes com CM entre 2012 e 2015. As pacientes foram consecutivamente selecionadas conforme critérios de inclusão, os quais serão detalhadamente expostos a seguir. Realizaram exame de ressonância magnética antes de serem submetidas ao tratamento quimioterápico com derivados da Antraciclina, para obtenção dos dados basais, e até 3 vezes após o final do tratamento, com mediana do tempo de 140, 231 e 427 dias após o início da quimioterapia (Figura 3). Para a análise longitudinal os estudos de RMC foram divididos em quartis de tempo entre a data de início da quimioterapia e cada um dos exames.

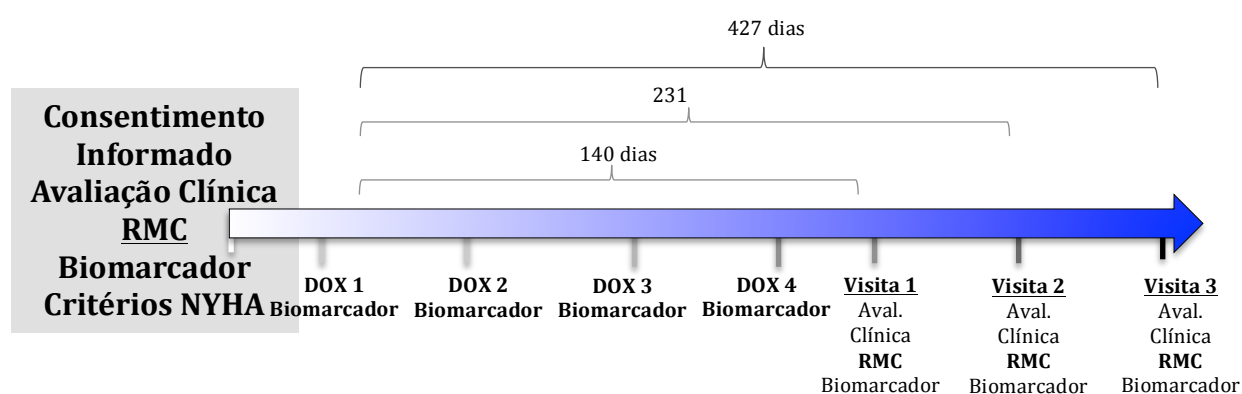


Figura 3: Linha do tempo do estudo

O exame de ressonância magnética seguiu o protocolo abaixo, sendo que todas as sequências utilizadas são comercialmente oferecidas por todos os fabricantes de aparelhos de ressonância magnética, tendo sido aprovadas tanto pela Food an Drugs Administration como pelos órgãos reguladores nacionais. Antes de cada RMC todas as pacientes passaram por uma criteriosa análise clínica que envolveu entrevista clínica com histórico médico detalhado do paciente, avaliação laboratorial, antropometria, além de exame físico padrão e classificação em relação aos sintomas de insuficiência cardíaca utilizando critérios da New York Heart Association.

Uma amostra de sangue periférico foi colhida no mesmo dia do início de cada ciclo de quimioterapia e nos dias de exame da RMC. Glicemia, hemoglobina glicada, triglicérides, colesterol de alta densidade (HDL) e colesterol de baixa densidade (LDL) foram coletados anteriormente ao início da quimioterapia (Beckman Coulter, AU5800 Beckman Coulter Analyzer, United States). Proteína C-reativa (PCR) (Siemens Cardiophase, BN ProSpec System, Siemens Healthineers, Germany), creatina quinase (CK) (Beckman Coulter, AU5800 Beckman Coulter Analyzer, United States), creatina quinase banda miocárdica (CKMB) (AU5800 Beckman Coulter Analyzer) e troponina T ultrasensível (cTnT) (Roche, Cobas e601 immunoassay analyzers, Roche Diagnostics, Germany) foram colhidas imediatamente antes e após cada ciclo de antraciclina, e antes de cada exame de RMC (Figura 3), além da dosagem do hematócrito (que será utilizado para cálculo do “índice de fibrose”).

Radioterapia foi aplicada em 25 pacientes (5040 cGy; bilateral, n=1; lado esquerdo, n=14; lado direito, n=10) com mediana do tempo de 183 dias após a primeira RMC (intervalo interquartil 160-266 dias). Trastuzumabe foi iniciado após o último exame de RMC, quando clinicamente indicado.

3.2. Critérios de Inclusão

- Pacientes do sexo feminino com câncer de mama e mais de 18 anos, encaminhadas como casos novos para o ambulatório de oncologia mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com planejamento de tratamento com quimioterápicos derivados do grupo da Antraciclina, com dose cumulativas programadas de 240 mg/m² de Doxorubicina.

3.3. Critérios de Exclusão

- Contra-indicações formais para a realização de exames de ressonância magnética, como portadores de marcapassos ou desfibriladores cardíaco de qualquer tipo,

clips metálicos para aneurismas cerebrais, implantes cocleares e válvulas de derivação ventrículo peritoneal.

- Insuficiência renal com taxa de filtração glomerular $< 40 \text{ ml/min/1.73 m}^2$
- História pregressa de infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva ou revascularização miocárdica, quer seja percutânea ou cirúrgica.
- História pregressa de cardiopatia valvar significativa.
- História pregressa de cardiomiopatias.

3.4. Metodologia

3.4.1. Ressonância Magnética Cardíaca

Os exames de ressonância cardíaca foram realizados no Hospital das Clínicas da UNICAMP em aparelho de 3.0 Tesla (Achieva 3.0 Tesla system, Philips Healthcare, The Netherlands), com software cardíaco e bobinas de sinergia com 5 elementos. O protocolo do estudo envolve aquisição de imagens eletrocardiograficamente sincronizadas, com sequências em cine SSFP (TrueFISP) já bem estabelecidas para determinação das funções ventriculares e volumes tanto do VE como do ventrículo direito (volume sistólico e diastólico, fração de ejeção ventricular esquerda e direita, espessura das paredes e massa ventricular). Após as imagens em cine, foram realizadas aquisições ponderadas em T2 no eixo curto, para avaliação do edema miocárdico e em T1 antes e após a administração de contraste, respeitando a dose máxima cumulativa clinicamente aprovada de gadolínio-DTPA (0,2 mmol/kg de gadoterato de meglumina, Dotarem, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France), através de uma sequência tipo “look locker” com pausa respiratória de 10-15 segundos, que consiste em uma série de imagens ponderadas em T1 com diferentes tempos de inversão. A “look locker” para medição do T1 é uma sequência tipo cine em gradient-echo com resolução temporal de 90 ms para as medidas pré-contraste e com 60 ms para as medidas pós-contraste. Os dados foram obtidos com uso de pulso de inversão não seletivo tipo adiabático, sendo que a aquisição foi feita em pelo menos 15 batimentos cardíacos. Utilizou-se os seguintes parâmetros: TR/TE/flip angle = 5/2.2 ms/10°; espessura de corte = 8 mm; matriz 192 x 100; FOV = 340 x 340 mm; NEX=1). Com estas múltiplas aquisições foram obtidas medições suficientes de T1 para determinação do coeficiente de partição, do “índice de fibrose” do miocárdio, VEC e τ_{ic} . Em seguida às aquisições dos dados de T1, se adquiriram as imagens de realce tardio padrão, conforme técnica previamente descrita (espessura de corte de 8 mm;

matriz 256 x 256; pulso de inversão de recuperação de 180°; tempo de inversão variando de 230 a 300 msec; FOV de 350 x 280 mm, com resolução espacial de 1,5 x 1,1mm, flip angle = 30°), para comparação com o “índice de fibrose”. Todos os exames da ressonância magnética foram realizados com as pacientes em decúbito horizontal dorsal, sob monitorização eletrocardiografia e supervisão direta de um médico com treinamento específico em ressonância magnética cardiovascular.

As imagens foram analisadas utilizando o *software* MASS CMR (Mass Research, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands). Métodos padrões foram utilizados para aferição da massa do VE e função⁴⁵, com medidas indexadas pela superfície corporal. Para análise do edema nas imagens ponderadas em T2 a média da intensidade de sinal do miocárdio foi normalizada pelo sinal do músculo esquelético na mesma imagem⁴⁶. Para as imagens Look-Locker, o VE foi dividido em seis segmentos padrões. A intensidade de sinal foi relacionada com o tempo para cada segmento e corrigida por uma amostra de sinal do sangue no ventrículo para determinar o T1. O R1 do miocárdio foi então utilizado como uma função do R1 do sangue como um modelo de dois compartimentos do transporte transcitolêmico da água, como já descrito por nosso grupo^{47,48}. O VEC do miocárdio e o τ_{ic} , uma medida proporcional ao diâmetro do cardiomiócito⁴⁰, foram os parâmetros ajustados, enquanto o hematócrito foi o parâmetro fixo deste modelo.

3.4.2. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando R (versão 3.3.2, R Foundation; <http://www.R-project.org/>). As variáveis contínuas foram expressadas como médias \pm desvio padrão. O tempo de seguimento em dias foi calculado a partir do início da quimioterapia para cada paciente. Modelo linear de efeitos mistos (MLM) (pacote *lme4* em R) foi utilizado para as variáveis que se repetiam ao longo do tempo como o VEC, τ_{ic} , massa do VE e a FEVE em cada paciente. As características demográficas foram estratificadas e comparadas utilizando teste *t* ou *Fisher* quando adequado. Os dados derivados da quantificação do T1 (coeficiente de partição e “índice de fibrose”) foram comparados com testes paramétricos ou não paramétricos conforme a apresentação da sua distribuição. Valores com $p < 0,05$ foram considerados como significantes. Foi também correlacionada a variação longitudinal entre os exames de ressonância magnética com os dados clínicos e laboratoriais utilizando métodos de regressão linear/longitudinal ou ANOVA/ANCOVA quando apropriado. Foram também identificados preditores da FEVE após antraciclinas com o tempo, através da inclusão de potenciais efeitos modificadores como τ_{ic} basal acima da mediana.

4. RESULTADOS

As características da população estudada são mostradas na Tabela 1. Nenhuma das pacientes apresentava diabetes ou história de angina ou de infarto do miocárdio. Os valores basais da FEVE ($69.4 \pm 3.6\%$) e da massa indexada do VE ($51.4 \pm 8.0 \text{ g/m}^2$) eram normais. A mediana do escore de risco de Framingham para evento cardiovascular em 10 anos⁴⁹ foi 5% (variação: 1,4 – 21,1%), e a mediana do risco ajustado para a idade (aumento do risco comparado a pacientes femininas, da mesma idade e sem outros fatores de risco) foi 2,9% (variação: 0-17,7%).

Tabela 1: Características gerais

Dados clínicos de demográficos basais	
Idade	51,8±8,9
Índice de massa corpórea, kg/m ²	26,9±3,6
Superfície corporal, m ²	1,8±0,1
Frequência cardíaca	72,2±11,4
Hipertensão	22,2(6)
Diabetes	0(0)
Dislipidemia	14,8(4)
Tabagismo	22,2(6)
Ex-tabagismo	11,1(3)
Escore de Framingham para evento cardiovascular, % (variação)	5(1,4-21,1)
Risco de Framingham ajustado para a idade, % (variação)	2,9(0-17,7)
Medicação em uso	
Inibidor da enzima conversora da angiotensina, %, (N)	14,8(4)
Aspirina, %, (N)	3,7(1)
β-bloqueador, %, (N)	3,7(1)
Estatina, %, (N)	14,8(4)
Metformina, %, (N)	0(0)
Insulina, %, (N)	0(0)
Análise laboratorial	
HDL, mg/dL	59,2±14,9
LDL, mg/dL	144,2±28,3
Triglicerídeos, mg/dL	120,3±34,9
PCR, mg/L	0,3±0,2
Glicemia, mg/dL	89,2±12,9
Leucócitos, 10 ³ /mm ³	5,5±0,3
Taxa de filtração glomerular, mL/min	125,4±35,3
Os dados são apresentados como média±desvio padrão, n(%) ou mediana (variação) conforme apropriado	

As medidas de volume do átrio e ventrículo esquerdos, e a função sistólica do ventrículo esquerdo são demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2: Medidas da RMC basal e durante o seguimento

Tempo após a quimioterapia	Basal	(79,146]	(146,231]	(231,350]	(350,700]
N	27	16	19	14	16
FEVE, %	69.4 ± 3.6	61.1 ± 7.6 ^{&}	55.99 ± 5.0 ^{&}	53.8 ± 8.4 ^{&}	57.5 ± 6.1 ^{&}
VDFi do VE, mL/m ²	60.2 ± 9.9	64.3 ± 9.6	66.7 ± 17.7*	56.9 ± 18.5	59.2 ± 12.6
VSFi do VE, mL/m ²	18.3 ± 4.0	24.7 ± 7.3 [#]	29.0 ± 7.3 ^{&}	26.2 ± 9.7 ^{&}	25.3 ± 8.2 ^{&}
Massa indexada do VE, g/m ²	51.4 ± 8.0	45.3 ± 3.8 ^{&}	43.2 ± 4.9 ^{&}	39.9 ± 5.4 ^{&}	36.0 ± 6.1 ^{&}
Massa/Volume do VE	0.86 ± 0.15	0.70 ± 0.12 [#]	0.68 ± 0.18 ^{&}	0.75 ± 0.28 [#]	0.61 ± 0.13 ^{&}
ViAE, mL/m ²	30.5 ± 8.3	32.0 ± 5.6	33.3 ± 9.0	33.5 ± 8.4*	35.8 ± 8.6*

Os dados são mostrados como média±desvio padrão. FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VDFi: volume diastólico final indexado; VE: ventrículo esquerdo; VSFi: volume sistólico final indexado; ViAE: volume indexado do átrio esquerdo.

*Valor com diferença significativa do basal (p<0,05)

[#]Valor com diferença significativa do basal (p<0,01)

[&]Valor com diferença significativa do basal (p<0,001)

O tempo de seguimento após o início da quimioterapia variou de 79 a 700 dias. Os intervalos dos quartis de tempo foram: (79,146], (146,231], (231,350], e (350,700], onde o colchete indica a inclusão do valor limítrofe, enquanto que o parênteses indica sua exclusão. FEVE, massa indexada do VE e a relação entre massa e volume do VE reduziram significativamente em relação aos valores basais durante todos os intervalos do seguimento (p<0,01; Figuras 4a, b e d). Foi observado também um aumento significativo da razão da intensidade de sinal em T2 do miocárdio sobre o músculo esquelético durante o período de (146-231] dias de seguimento (Figura 4c). O VEC aumentou de 0,32±0,038 pré-tratamento, para 0,36±0,04 (aumento de 11%) no período de (350-700] dias (p=0,0035) (Figura 5a). O τ_{ic} , uma medida não invasiva do tamanho do cardiomiócito, apresentava média de 169±69 ms pré-DOX, com redução após o tratamento de 62 ms, para 119±54 no período (350-700] dias (p<0,004) (Figura 5b). A redução aproximada de 30% de τ_{ic} , e o aumento o VEC são consistentes com a mudança observada na massa do VE.

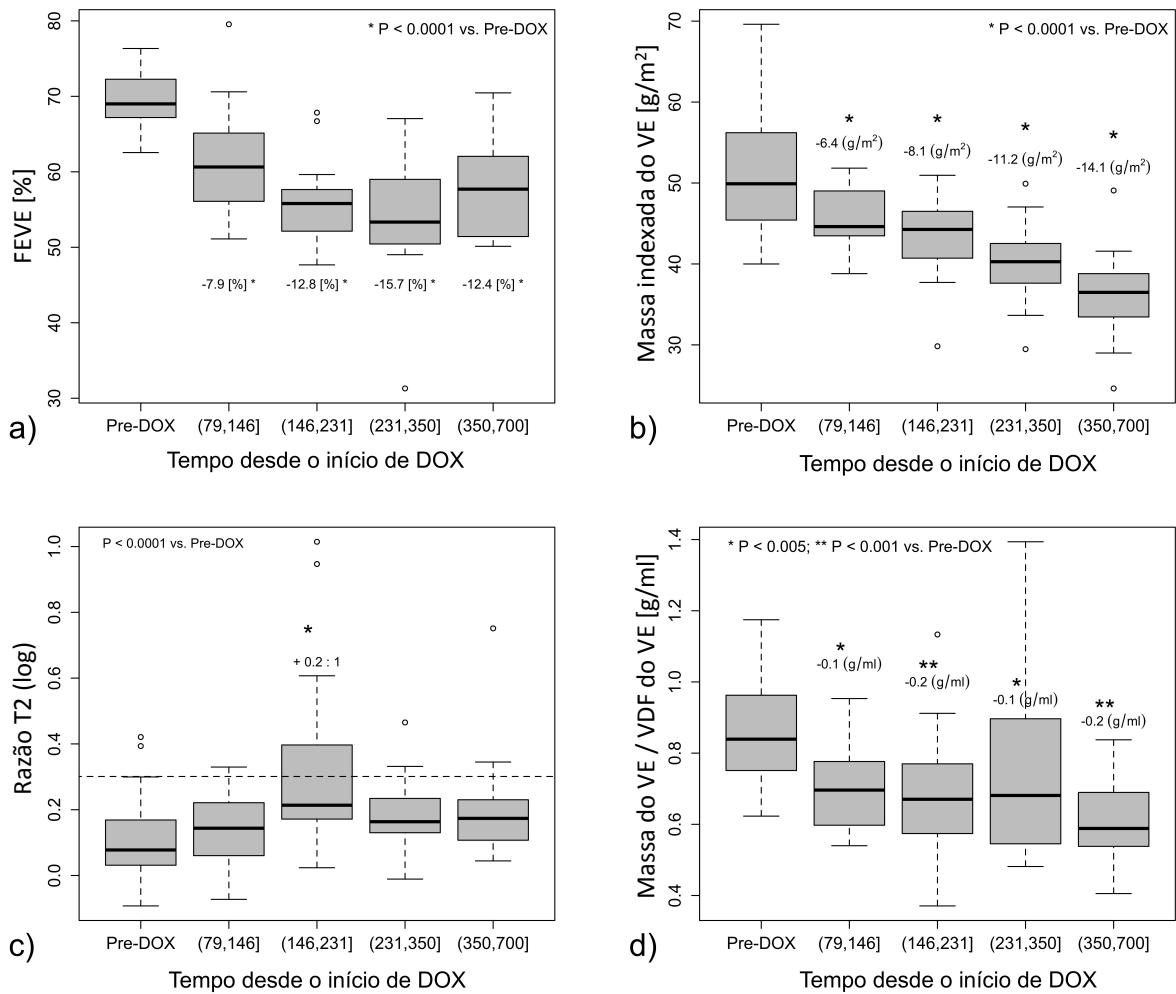


Figura 4: a) FEVE basal e após a terapia com doxorubicina. A FEVE reduziu significativamente em todos os intervalos de tempo após a terapia ($p < 0,001$). b) A massa indexada do VE também reduziu após doxorubicina ($p < 0,001$). c) A razão da intensidade de sinal em T2 do miocárdio sobre o músculo esquelético foi significativamente maior no segundo quartil de tempo do seguimento (146-231 dias) comparado ao valor basal ($p < 0,001$), com tendência à normalização nos demais períodos. A linha pontilhada horizontal corresponde a uma razão de sinal de 2:1, limite utilizado para a definição de edema miocárdico. d) A relação da massa sobre volume do VE após terapia com antraciclina foi inferior ao valor basal em todos os períodos ($p < 0,001$).

O VEC e o τ_{ic} também foram analisados utilizando-se um MLM com o número de dias após o início de DOX como a variável contínua, conforme demonstrado nas Figuras 5c e 5d. A massa indexada do VE apresentou forte associação com τ_{ic} ($b = 4,1 \pm 1,5$ g/m² para cada aumento de 100 ms em τ_{ic} ; $p = 0,007$), porém não com o VEC ($p = 0,16$). A radioterapia foi associada com pior remodelamento do VE, caracterizada pela razão da massa sobre o volume

do VE, no intervalo de (175,418] dias após DOX (estimativa: $-0,27 \pm 0,12$; $p=0,023$), mas não causou efeito significativo na FEVE, VEC ou τ_{ic} .

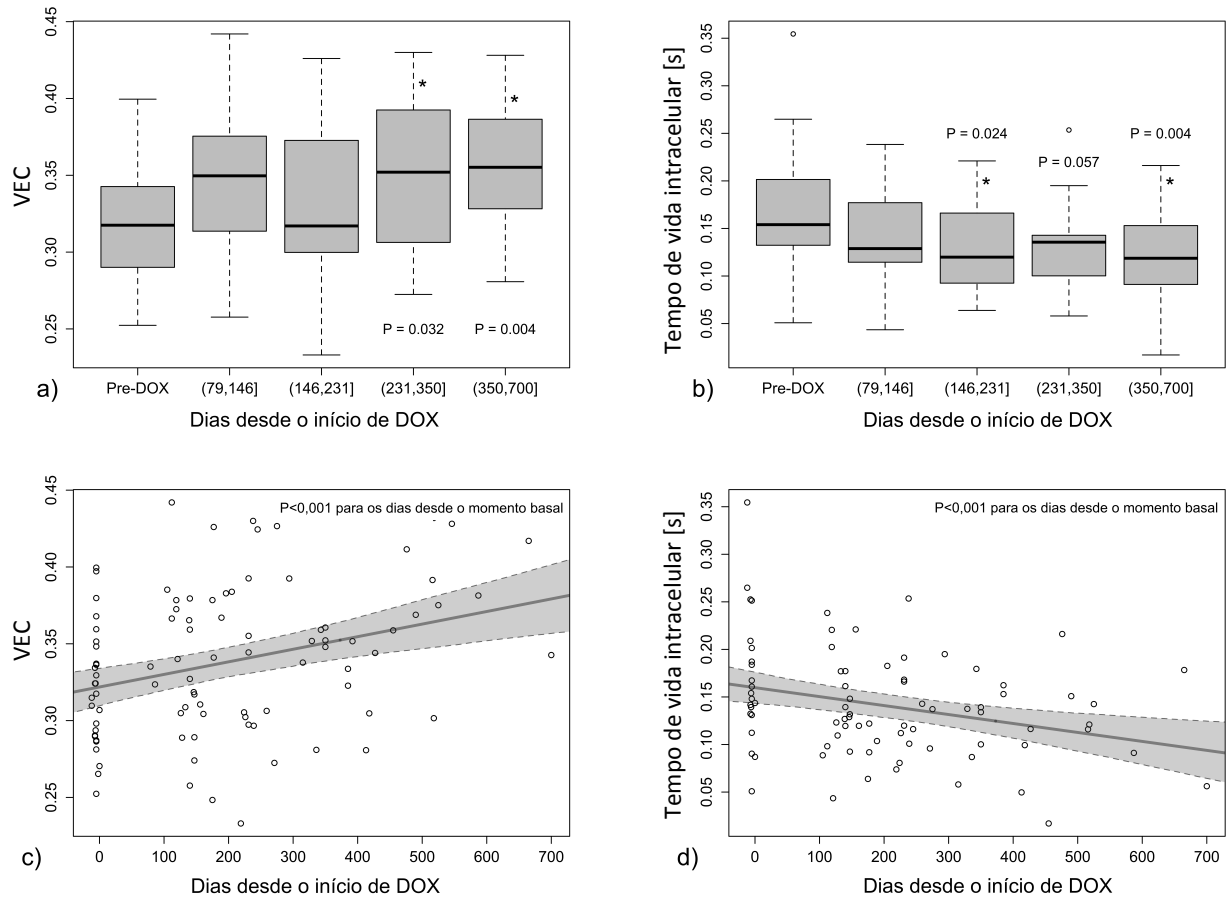


Figura 5: Valores do VEC (a) e de τ_{ic} (b) basais e após o uso de antraciclina, com o período de seguimento dividido em quartis. O VEC foi significativamente maior para os dois períodos compreendidos entre 231 e 700 dias pós-DOX, enquanto houve redução de τ_{ic} , indicando atrofia dos cardiomiócitos como resposta às antraciclina. As linhas em (c) e (d) representam os preditores do VEC e do τ_{ic} utilizando o tempo como efeito fixo em um MLM. As áreas acinzentadas ao redor da linha de regressão representam o percentil 95 da mesma.

Os biomarcadores séricos estão resumidos na Tabela 3. A cTnT aumentou significativamente de $4,6 \pm 1,4$ pg/mL no período pré-DOX para $21,3 \pm 14,4$ pg/mL no período entre (79,146] dias após o início da quimioterapia ($p < 0,001$), com posterior declínio. Como ilustrado na Figura 6a, o pico de cTnT ocorreu 120 dias após o início do tratamento. O pico de cTnT pós-DOX foi determinado para cada paciente, variando de 6 a 57 pg/mL (mediana=14 pg/mL, intervalo interquartil=10,5 pg/mL). O escore de risco de Framingham

para evento cardiovascular em 10 anos não apresentou efeito significativo nos valores de cTnT durante a quimioterapia e ao longo do acompanhamento, conforme demonstrado na figura 6a.

Tabela 3: Medidas laboratoriais basais e durante o seguimento

Tempo após a quimioterapia	Basal	(79,146]	(146,231]	(231,350]	(350,700]
N	27	16	19	14	16
CKMB, U/L	13,6±6,1	19,8±11,7*	19,1±8,5*	15,8±8,5	17,2±7,8
PCR ultra sensível, mg/L	0,3±0,2	0,4±0,5	0,3±0,2	0,12±0,7*	0,3±0,4
cTnT, ng/dL	4,6±1,4	21,3±14,4*	10,7±3,2*	6,6±3,7*	5,2±1,6
Hemoglobina, g/L	13,1±0,9	12,1±1,0*	12,1±1,0*	12,1±0,8*	12,1±1,0*
Hematócrito, %	39,8±2,5	36,4±2,8*	36,5±2,8*	36,1±2,6*	37,1±2,8*
Os dados são mostrados como média±desvio padrão. CKMB: creatina quinase banda miocárdica; PCR: proteína C-reativa; cTnT: troponina cardíaca T					
*Valor com diferença significativa do basal (p<0,05)					

Com o intuito de avaliar os efeitos da injúria miocárdica, especialmente nos cardiomiócitos, foi estimada a massa dos cardiomiócitos (MC) do VE a partir do produto da fração do volume intracelular (1-VEC) pela massa total do VE. A massa dos cardiomiócitos indexada reduziu pós-DOX ($p<0,001$; Figura 6b), com uma queda prevista de $-10,9\pm1,1$ para o intervalo de 351-700 dias, a partir dos valores basais de $34,7\pm5,4 \text{ mL/m}^2$, o que corresponde a um decréscimo de 31,4% na MC indexada. A redução da MC após as antraciclina foi mais acentuada nos pacientes com pico de cTnT $> 10 \text{ pg/mL}$, sendo este um valor de cTnT que parece estar associado a aumento do risco de IC⁴⁹⁻⁵¹ (Figura 6b). Pacientes com pico de cTnT $> 10 \text{ pg/mL}$ não tiveram aumento significativo no risco de evento cardiovascular ($p=0,49$ para o teste de Wilcoxon pareado). Outra análise similar da massa do VE mostrou um frágil efeito do pico de cTnT $> 10 \text{ pg/mL}$, sugerindo que a MC é mais sensível que a massa total do VE na injúria miocárdica pós-DOX. O declínio da FEVE foi máximo aproximadamente 100-150 dias após o pico de cTnT (Figuras 6a e 6c).

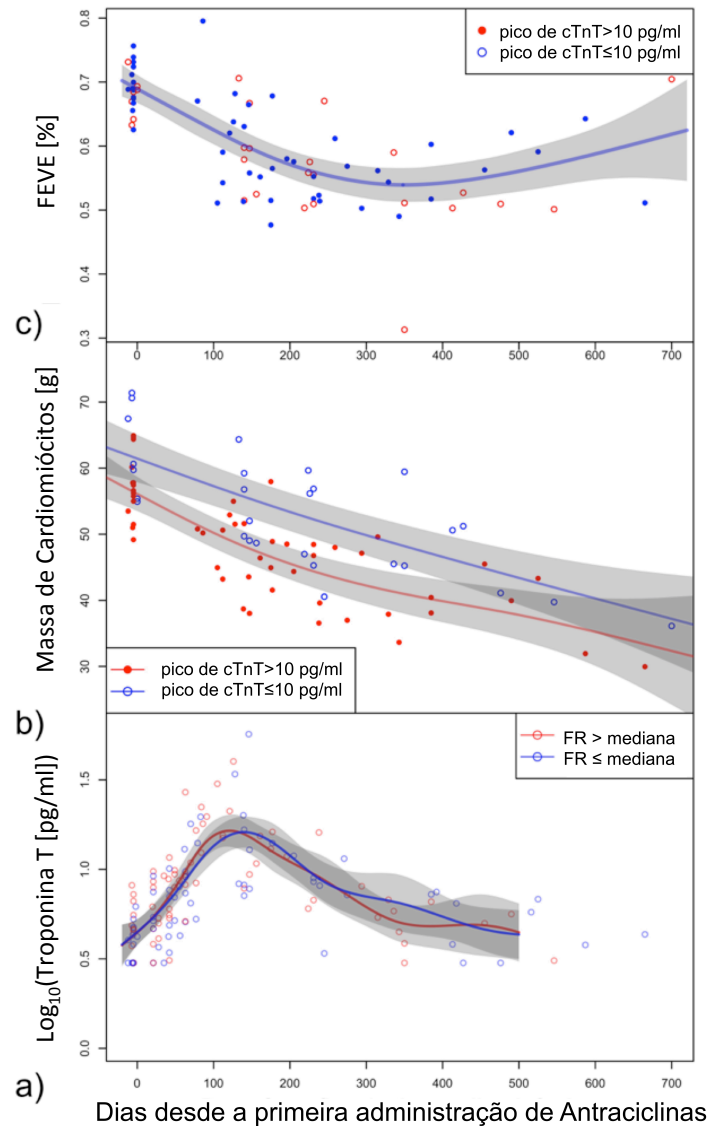


Figura 6: a) A cTnT mudou significativamente entre os valores basais e os aferidos ao fim do seguimento, com o pico cerca de 120 dias após o início da quimioterapia (aproximadamente 50 dias após o último ciclo). A linha azul representa pacientes com escore de risco de Framingham para evento cardiovascular em 10 anos acima da mediana, enquanto a linha vermelha representa aqueles com escore igual ou menor que a mediana. As áreas cinzas ao redor das linhas azul e vermelha representam a variação dos percentis 95. b) Em cada paciente, a perda da MC pós-DOX se associou ao pico de cTnT. As linhas vermelha e azul representam os valores previstos da MC pós-DOX em dois grupos de pacientes, o primeiro com pico de cTnT ≤ 10 pg/mL e o segundo > 10 pg/mL. c) A disfunção sistólica, aferida pela FEVE, reduziu após a quimioterapia, com nadir cerca de 300 dias após o início de DOX, acontecendo posteriormente ao pico de cTnT. Houve redução significativa da MC ao longo do tempo em ambos os grupos, porém ocorreu de maneira mais acelerada nos pacientes com pico > 10 pg/mL, quando comparado ao grupo ilustrado pela linha azul.

4.1. Preditores de Disfunção do Ventrículo Esquerdo após Antraciclina

Pacientes que apresentavam cardiomiócitos com tamanho basal acima da mediana (154 ms) se associaram a maior disfunção sistólica pós-DOX, quando comparados àqueles com τ_{ic} basal igual ou abaixo da mediana (Figura 7). As diferenças na FEVE baseadas no τ_{ic} ocorrem durante o seguimento, quando a FEVE alcança seu nadir, com uma discreta recuperação subsequente. A FEVE, durante o intervalo de tempo de (231,350] dias, foi de $49\pm 11\%$ nos pacientes com τ_{ic} basal acima da mediana, enquanto no grupo com τ_{ic} basal menor ou igual a mediana foi de $57\pm 6\%$. De maneira semelhante, no período de (350,700] dias, o grupo com τ_{ic} basal acima da mediana apresentou FEVE de $54\pm 4\%$, enquanto que nos pacientes com τ_{ic} basal igual ou abaixo da mediana era de $59\pm 8\%$. Um MLM foi utilizado para avaliar a FEVE com τ_{ic} basal acima da mediana e o tempo de seguimento, com o intuito de identificar os efeitos do τ_{ic} basal neste intervalo de tempo. Pacientes com τ_{ic} basal acima da mediana apresentaram valor de FEVE $9,3\pm 3,6\%$ menor no período de (231,350] dias ($p=0,013$), e $8,5\pm 3,5\%$ menor entre (350,700] dias ($p=0,019$), quando comparado ao grupo com τ_{ic} basal igual ou abaixo da mediana, que já apresentava um declínio significativo da FEVE após antraciclina ($p<0,002$). O PCR basal acima da mediana apresentou interação significativa com a razão do sinal de T2 logaritmicamente transformada no período entre (146,231] dias pós-DOX ($p=0,0002$) e também após 350 dias ($p=0,021$). O PCR acima da mediana também se associou com maior declínio do τ_{ic} após a terapia com antraciclina ($p=0,039$). O valor do LDL basal acima da mediana apresentou associação significativa com o declínio da função sistólica entre 231 e 350 dias pós-DOX ($p=0,029$), período do nadir da FEVE, que apresentou leve melhora posteriormente. O valor do LDL basal acima da mediana ainda foi associado com maior valor do VEC ($p=0,024$). Notou-se uma tendência de redução na FEVE no intervalo de 231-350 dias pós-DOX nos pacientes que apresentavam a contagem basal de leucócitos acima da mediana ($p=0,07$). Valores basais de PCR não apresentaram associação com a FEVE em nenhum momento antes, durante ou após o uso das antraciclina. Tanto o escore de risco de Framingham para evento cardiovascular em 10 anos, quanto o risco ajustado para a idade (aumento do risco comparado a pacientes femininas, da mesma idade e sem outros fatores de risco) não tiveram associação significativa com o remodelamento do VE pós-DOX.

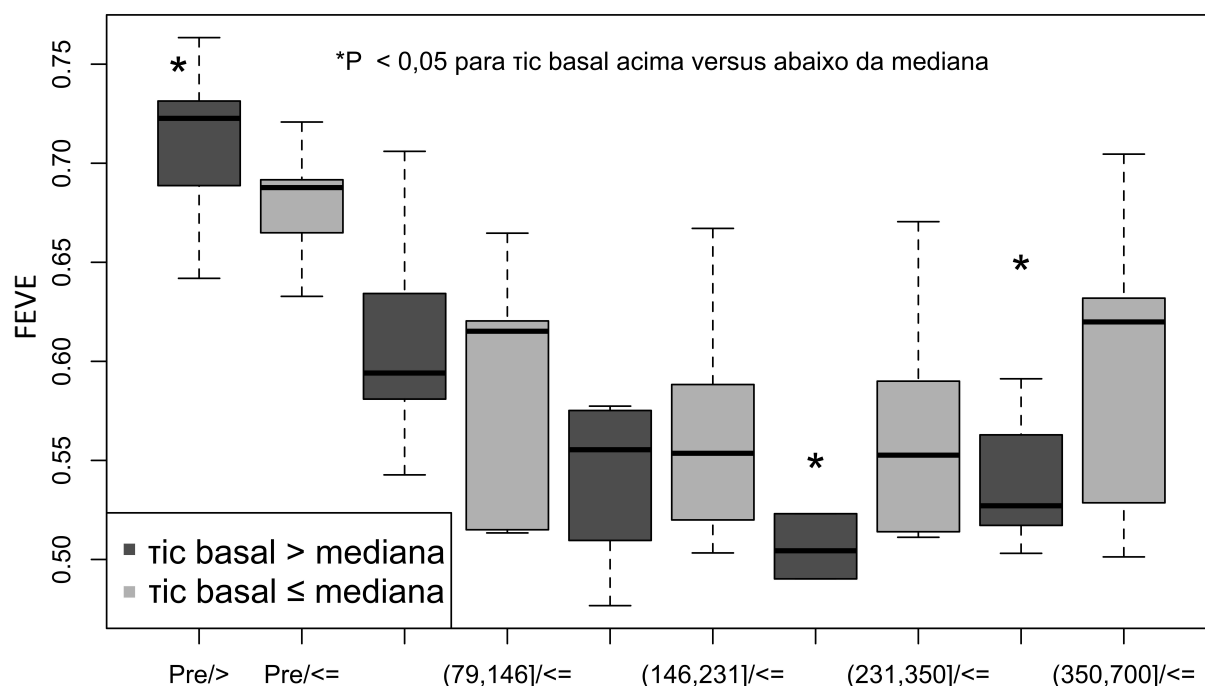


Figura 7: FEVE basal e durante o seguimento, estratificada pelo valor da mediana de basal de τ_{ic} . Houve redução significativa da FEVE pós-DOX nos dois subgrupos ($p \leq 0,001$). Evidencia-se que o subgrupo com τ_{ic} basal acima da mediana teve maior declínio da FEVE nos períodos de (231,350] dias ($p=0,013$), e (350,700] dias ($p=0,019$) após o tratamento, quando comparados ao subgrupo de pacientes com τ_{ic} basal igual ou abaixo da mediana.

4.2. ARTIGO: DOXORUBICIN-ASSOCIATED CARDIAC TISSUE REMODELING IN BREAST CANCER PATIENTS: A CARDIAC MAGNETIC RESONANCE COHORT STUDY

Artigo que foi submetido ao Journal of the American College of Cardiology no dia 09/08/2017 e está em processo de revisão.

Comprovante da submissão do artigo:

JACC080717-3057

9/12/17, 14:38

[Home](#)
[Author Instructions](#)
[Reviewer Instructions](#)
[Contact Us](#)
[Disclosures](#)
[FAQ](#)
[JACC Journals](#)
[Logout](#)
[Journal Home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	JACC080717-3057
Current Revision #	0
Submission Date	2017-08-09 16:41:18
Current Stage	Manuscript Under Review
Title	Anthracycline Therapy is Associated with Cardiomyocyte Atrophy and Pre-Clinical Manifestations of Heart Disease
Running Title	Anthracycline Therapy is Associated with Cardiomyocyte Atrophy
Manuscript Type	New Research Papers
Special Issues	N/A
Topic	Imaging
Manuscript Comment	<p>Suggested reviewer to include:</p> <p>1-Dr. Ricardo Cury - email: rcury@baptisthealth.net 2-Dr. Jose AC Lima - email: jlma@jhmi.edu 3- Dr. Steffen Petersen - email: s.e.petersen@qmul.ac.uk</p> <p>Suggested reviewer to exclude:</p> <p>1- Dr. James Moon 2- Dr. Martin Ugander</p>
Corresponding Author	Otávio Coelho-Filho (Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil)
Contributing Authors	Thiago Ferreira de Souza, Thiago Quinaglia A C Silva, Felipe Osorio Costa, Ravi Shah, Tomas G. Neilan, Licio Velloso, Wilson Nadruz, Fabrick Carvalho Spottito, Jose Mattos, Fernando Cendes, Otavio Rizzi Coelho, Michael Jerrold-Herold
Abstract	<p>Background: Serum biomarkers of cardiac dysfunction, while elevated after chemotherapy, lack specificity for myocardial tissue alterations. The goal to demonstrate that cardiac magnetic resonance (CMR) could reveal anthracycline-induced early tissue remodeling, and its relation to cardiac dyshomeostatic ventricular atrophy.</p> <p>Methods: Twenty-seven women with breast cancer (mean-age 51.8±8.9 years, BMI 26.9±3.6 kg/m²), underwent CMR prior, and up to 3-times after anthracycline. CMR variables were left ventricular ejection fraction (LVEF), normalized T2-weighted signal intensity for myocardial edema, extracellular volume (ECV), cardiomyocyte mass, intra-cellular lifetime of water, (T1ρ, marker of cardiomyocyte size), and late gadolinium enhancement (LGE).</p> <p>Results: At baseline, all subjects had normal LVEF (69.4±3.6%) and LV mass-index (51.4±8.0 g/m²), an ECV of 0.32±0.038, T1ρ of 169±69 ms, and T1ρ days after anthracycline (240 mg/m²), LVEF declined by 12% to 58±8% (P<0.001), LV mass index by 19 g/m² to 36±9 g/m² (P<0.001), and ECV increased to 0.38±0.04 (P=0.004), while T1ρ decreased to 119±54 ms (-52 ms; P=0.004). Myocardial edema peaked at ~146-231 days (P<0.001). The LV mass associated with T1ρ (β=4.1±1.5 g/m² per 100 ms increase of T1ρ; P=0.007), but not with ECV. Cardiac Troponin T (cTnT; 4.6±1.4 pg/ml at baseline) is significantly after anthracycline (P<0.001). The total LV cardiomyocyte mass, estimated as (1-ECV) x LV mass, declined more rapidly after anthracycline cTnT > 10 pg/ml.</p> <p>Conclusions: A decrease of LV mass after anthracycline was predominantly associated with cardiomyocyte atrophy, rather than interstitial matrix changes. LV cardiomyocyte mass increased with the degree of cardiomyocyte injury, assessed by peak cTnT after anthracycline.</p>
Condensed Abstract	<p>This study investigated whether cardiac magnetic resonance (CMR) could reveal anthracycline-induced early tissue remodeling. Twenty-seven women with breast cancer, underwent CMR prior, and up to 3-times after anthracycline. LVEF declined by 12%, and LV mass index by 19 g/m² (P<0.001). Extracellular volume increased at 351-700 days to 0.38±0.04 (P=0.004), while intra-cellular lifetime of water decreased to 119±54 ms (P=0.004). The total LV cardiomyocyte mass declined more rapidly with peak cTnT > 10 pg/ml after anthracycline. A decrease in LV mass after anthracycline was predominantly associated with cardiomyocyte atrophy, rather than interstitial matrix changes.</p>
Key Words	anthracycline, fibrosis, left ventricular remodeling, T1 mapping techniques, magnetic resonance imaging
Relationship with Industry	No, there is no relationship with industry that I should disclose, having read the above statement.
Clinical Trial	ID: DOX-0675014600011 NCT030000036 https://register.clinicaltrials.gov/prs/app/action/SelectProtocol?sid=S0008NX3&selection=Edit&uid=U0003C4H&ts=2&cs=ch82q
Copyright Release Date	Not Received

Stage	Start Date
Manuscript Under Review	2017-08-09 16:41:18
	2017-08-09 16:41:18
Manuscript Under Review	2017-08-08 21:22:05
Author Approved Converted Files	2017-08-08 21:22:05
Preliminary Manuscript Data Submitted	2017-08-07 20:21:30

Powered by

https://www.jaccsubmit.org/cgi-bin/main.plex?form_type=status_d...=11&ms_id=152004&ms_rev_no=0&ms_id_key=ftdCt81jGyaceHQRwdIn7g

Page 1 of 1

Anthracycline Therapy is Associated with Cardiomyocyte Atrophy and Pre-Clinical Manifestations of Heart Disease

Thiago Ferreira de Souza MD^a, Thiago Quinaglia A C Silva, MD PhD^a, Felipe Osorio Costa MD^a, Ravi Shah MD^b, Tomas G Neilan, MD MPH^b, Lício Velloso MD PhD^a, Wilson Nadruz MD PhD^a, Fabricio Brenelli MD^a, Andrei Carvalho Sposito MD PhD^a, Jose Roberto Mattos MD PhD^a, Fernando Cendes MD PhD^a, Otávio Rizzi Coelho MD PhD^a, Michael Jerosch-Herold PhD^c, Otavio Rizzi Coelho-Filho MD PhD MPH^a

Word count: 4495

- a. Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil
- b. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
- c. Noninvasive Cardiovascular Imaging Program and Department of Radiology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

Brief Title: Anthracycline Therapy is Associated with Cardiomyocyte Atrophy

Disclosures (including any relationship with industry): All authors (T.F.S., T.Q.A.C.S., F.O.C., R.S., T.G.N., L.V., W.N., F.B., A.C.S., J.R.M., F.C., O.R.C., M.J.H. and O.C.R.F.) declare no conflict of interest.

Correspondence to: Otávio Rizzi Coelho-Filho MD, MPH, PhD.

Assistant Professor of Medicine
Division of Cardiology, Department of Medicine,
State University of Campinas (UNICAMP),
Rua Tessália Viera de Camargo, 126
Campinas - SP - Brasil - CEP 13083-887
Tel: +55 19 996038484, Fax: +55 19 35218788
Email: orcfilho@unicamp.br

Acknowledgments:

The authors thank the CMR biomedical technologists Juliana Francischinelli and Vanessa Bettini for their efforts with CMR scanning of the patients in this study.

Sources of Funding

Dr Coelho-Filho is supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Productivity in Research award grant (303366/2015-0) and travel award grant (453960/2016-2). Dr. Coelho-Filho is also supported by a Young Investigators Grant from The São Paulo Research Foundation (2015/15402-2). Dr. Neilan has the following support: The Kohlberg Foundation, an American Heart Association Fellow to Faculty Award (12FTF12060588), National Institutes of Health/ National Heart, Lung, and Blood Institute (1R01HL130539-01A1; 1R01HL137562 - 01A1) and National Institutes of Health/ Harvard Center for AIDS Research (P30 AI060354).

Abstract

Background: Serum biomarkers of cardiac dysfunction, while elevated after chemotherapy, lack specificity for the mechanism of myocardial tissue alterations. The goal of this study was to demonstrate that cardiac magnetic resonance (CMR) could reveal anthracycline-induced early tissue remodeling, and its relation to cardiac dysfunction and left ventricular atrophy.

Methods: Twenty-seven women with breast cancer (mean-age 51.8 ± 8.9 years, BMI 26.9 ± 3.6 kg/m²), underwent CMR prior, and up to 3-times after anthracycline. CMR variables were left ventricular ejection fraction (LVEF), normalized T2-weighted signal intensity for myocardial edema, extracellular volume (ECV), LV cardiomyocyte mass, intra-cellular lifetime of water (τ_{ic} , marker of cardiomyocyte size), and late gadolinium enhancement (LGE).

Results: At baseline, all subjects had a relatively low 10-year Framingham cardiovascular (CV) event risk (median: 5%), normal LVEF ($69.4 \pm 3.6\%$) and LV mass-index (51.4 ± 8.0 g/m²), an ECV of 0.32 ± 0.038 , τ_{ic} of 169 ± 69 ms, and no LGE. At 351-700 days after anthracycline (240 mg/m²), LVEF declined by 12% to $58 \pm 6\%$ ($P < 0.001$), LV mass index by 19 g/m² to 36 ± 6 g/m² ($P < 0.001$), and ECV increased by 0.037 to 0.36 ± 0.04 ($P = 0.004$), while τ_{ic} decreased to 119 ± 54 ms (-62 ms; $P = 0.004$). Myocardial edema peaked at ~ 146 -231 days ($P < 0.001$). The LV mass index was associated with τ_{ic} ($\beta = 4.1 \pm 1.5$ g/m² per 100 ms increase of τ_{ic} ; $P = 0.007$), but not with ECV. Cardiac Troponin T (cTnT; 4.6 ± 1.4 pg/ml at baseline) increased significantly after anthracycline ($P < 0.001$). The total LV cardiomyocyte mass, estimated as $(1 - \text{ECV}) \times \text{LV mass}$, declined more rapidly after anthracyclines with peak cTnT > 10 pg/ml. There was no evidence for any significant interaction between the 10-year CV event risk, and the effect of anthracycline therapy.

Conclusions: A decrease of LV mass after anthracyclines was predominantly associated with

cardiomyocyte atrophy, rather than interstitial matrix changes. The loss of LV cardiomyocyte mass increased with the degree of cardiomyocyte injury, assessed by peak cTnT after anthracycline.

Keywords: anthracycline, cardiac troponin T, left ventricular remodeling, T1 mapping techniques, fibrosis, magnetic resonance imaging.

Condensed Abstract

This study investigated whether cardiac magnetic resonance (CMR) could reveal anthracycline-induced early tissue remodeling. Twenty-seven women with breast cancer, underwent CMR prior, and up to 3-times after anthracycline. At 351-700 days after anthracycline, LVEF declined by $12\pm 7\%$, and LV mass index by $19.3\pm 11.8\text{ g/m}^2$ ($P<0.001$). Extracellular volume increased at 351-700 days to 0.36 ± 0.04 ($P=0.004$), while intra-cellular lifetime of water decreased to $119\pm 54\text{ ms}$ (-62 ms ; $P=0.004$). The total LV cardiomyocyte mass declined more rapidly with peak cTnT $> 10\text{ pg/ml}$ after anthracyclines. A decrease in LV mass after anthracycline was predominantly associated with cardiomyocyte atrophy, rather than interstitial matrix changes.

Abbreviations and Acronyms:

AIC: anthracycline-induced cardiotoxicity

BC: breast cancer

CMR: cardiac magnet resonance

CRP: C-reactive protein

CK: creatine kinase

CKMB: creatine kinase myocardial band

cTnT: cardiac troponin T

ECV: extracellular volume

GFR: glomerular filtration rate

HF: heart failure

LME: linear mixed effects

LV: left ventricular

LVEF: left ventricular ejection fraction

τ_{ic} : intracellular lifetime of water

Introduction

Anthracyclines are commonly implicated in adverse effects on the cardiovascular system(1), including potentially irreversible cardiomyopathy and incident heart failure (HF)(2). Mortality secondary to HF from anthracycline-induced cardiotoxicity (AIC) ranges from 30 to 70%, and a third of patients do not show improvement in left ventricular ejection fraction (LVEF) with HF therapy(3). Thus, there is a need to better understand the effects and mechanisms of AIC. Detecting early alterations in myocardial structure and function may facilitate earlier intervention and reduce HF.

Recent experimental studies demonstrated that early and subclinical myocardial effects of AIC included increased levels of interstitial fibrosis, edema, and reduced cardiomyocyte size(4-6), which may all be potentially characterized by CMR.

In this study, we investigated AIC using novel cardiac magnetic resonance (CMR) makers of myocardial tissue remodeling including the extracellular volume (ECV) — a marker of interstitial fibrosis — and the intracellular lifetime of water (τ_{ic}) — a marker of cardiomyocyte size. We hypothesized that these novel CMR indices would further elucidate the *mechanisms* of myocardial injury in breast cancer (BC) patients treated with anthracyclines(7) and their relation to biochemical indicators.

Methods

Study design

Between 2012 and 2015, we enrolled 27 females with BC (clinical trials number: DOX-0675014600011). Patients were consecutively enrolled if they had received a BC diagnosis and had planned adjuvant anthracycline-based therapy (Doxorubicin in 4 cycles at 60mg/m^2 , total dose of 240mg/m^2). Exclusion criteria were contraindications to CMR, kidney disease ($\text{GFR} < 40\text{ml/min}$), previous myocardial infarction, clinical diagnosis of heart failure, or moderate and severe valve disease. Serial CMR scans were obtained at baseline and consecutive time points (Figure 1). In addition, detailed medical history, standard anthropometric data, and laboratory evaluation were performed alongside CMR. Our local Institutional Review Board approved the study (CAAE: 0675.0.146.000-11). All participants provided written informed consent prior to study enrollment.

Follow-up

Clinical assessment and CMR imaging were performed before and up to three times serially after the cumulative anthracycline treatment (median times: 140, 231, and 427 days from initiation of anthracyclines for visits 1, 2, and 3, respectively) (Figure 1). Since the CMR studies did not conform to an exact timetable (due to clinical exigencies and patient compliance), time ranges for study visits overlapped significantly (Online Table 1 in the online-only **Data Supplement**). For the longitudinal analysis, we therefore categorized the follow-up times into quartile ranges. Radiotherapy was performed in 25 patients (5040 cGy; bilateral, $n=1$; left side, $n=14$; right side, $n=10$) at median time of 183 days (IQR 160-266 days) after the baseline CMR exam. Trastuzumab, when clinically indicated, was initiated after the last CMR exam.

Biochemical analysis

Blood samples were obtained at baseline and at each anthracycline cycle and before each CMR examination. Glucose, glycated hemoglobin, triglycerides, high and low density lipoprotein cholesterol (Beckman Coulter, AU5800 Beckman Coulter Analyzer, United States) were obtained at baseline. CRP (Siemens Cardiophase, BN ProSpec System, Siemens Healthineers, Germany), CK, CKMB (Beckman Coulter, AU5800 Beckman Coulter Analyzer, United States) and high-sensitive troponin T (cTnT) (Roche, Cobas e601 immunoassay analyzers, Roche Diagnostics, Germany) were obtained at baseline, before and after each anthracycline cycle, and before each CMR visit.

Cardiac Magnetic Resonance

Patients were imaged in a 3T-system (Achieva, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) with a 5-element phased-array surface coil. The CMR protocol comprised the following electrocardiographically gated imaging sequences: a) breath-hold black-blood T2-weighted (T2w) imaging of edema in short-axis (5-10 slices with 10 mm thickness; repetition time $TR=2R-R$; echo-time $TE\sim 80ms$; echo train length, 20-30; matrix: 256x256; field of view: 340 to 360mm; number of averages, 1-2); b) cine imaging (SSFP with repetition time TR , 3.4 ms; echo time TE , 1.2ms; in-plane spatial resolution, 1.5mm) for left ventricular (LV) mass, volumes, LVEF; c) late gadolinium-DTPA enhancement (LGE) imaging with a segmented, phase-sensitive acquisition after magnetization inversion, triggered every other heartbeat, matched to cine imaging, 10 min after last contrast bolus (cumulative dose of 0.2mmol/kg of gadoterate meglumine, Dotarem, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France); and d) T1 mapping for ECV and intra-cellular lifetime water (τ_{ic}) with a Look-Locker sequence(8,9)

with segmented gradient-echo acquisition for 17 times after inversion (TE 2.7ms; TR 5.5ms; flip angle 10°; 192x128 matrix; 8-mm slice), covering approximately two cardiac cycles (TI increments: 100 ms pre-contrast and 55ms post-contrast, 8-mm slice thickness, TR>4RR intervals pre-contrast and 3RR intervals post-contrast). T1 imaging was repeated in the same mid-LV short-axis slice, before and five to seven times after the injection of gadolinium.

Quantification of LV function, myocardial edema, fibrosis and cardiomyocyte size by CMR

Images were analyzed with MASS CMR software (Mass Research, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands). Standard methods were used to measure LV mass and function(10). For T2w edema imaging, the mean segmental signal intensity was normalized by the signal intensity of skeletal muscle in the same slice to assess for edema(11). For the Look-Locker images, the LV wall was divided into six standard segments, and segmental T1 was determined by nonlinear, least-squares fitting to an analytic expression for the inversion recovery, and correction for the effects of radiofrequency pulses applied during the inversion recovery. Myocardial R1 (i.e. 1/T1) was then fit as a function of blood R1 with a two-compartment model of transcytoplasmic water exchange as previously described(8,12). The myocardial extra cellular volume (ECV) and intra cellular lifetime of water, “ τ_{ic} ”, a measure proportional to the cardiomyocyte diameter(13), were adjustable parameters, while the measured blood hematocrit was a fixed model-parameter.

Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using R (version 3.3.2, R Foundation; <http://www.R-project.org/>). Data are presented as means \pm standard deviation. The follow-up time in days, measured from the initiation of anthracyclines in each patient, was categorized into quartiles. Linear mixed effects (LME) regression models (package *lme4* in R) were used to analyze repeated measurements of ECV, τ_{ic} , LV mass, and LVEF in each patient. The LME

models included a random intercept per patient and follow-up time period (categorical variable with 5 levels) as a fixed effects predictor. To model non-linear change of a measurement variable with time as *continuous* parameter, we employed mixed-effects generalized additive models (GAM), using a cubic-regression spline for time(14), and a random intercept per patient. Variables were log-transformed when a quantile-quantile plot indicated significant deviation from a normal distribution. Bivariate correlation was assessed with Pearson's method, or alternatively with Spearman's method if the variable values were not normally distributed.

Results

Baseline clinical and imaging characteristics of the study population

Baseline characteristics of our study population are shown in Table 1. None of the study participants had evidence of diabetes or history of angina or myocardial infarction. LVEF ($69.4 \pm 3.6\%$) and LV mass index ($51.4 \pm 8.0 \text{ g/m}^2$) at baseline were normal. The median Framingham 10-year risk for a cardiovascular event (15) was 5% (range: 1.4 – 21.1%), and the median age adjusted risk (i.e. risk increment compared to patients of same age and female gender without other risk factors) was 2.9% (range: 0-17.7%).

Changes in global and tissue-specific cardiac indices with anthracycline-based chemotherapy

CMR measurements for LV and left atrial volumes, and LV systolic function are summarized in Table 2. The follow-up after anthracycline initiation covered a time span from 79 to 700 days. The quartile ranges for follow-up time were: (79,146], (146,231], (231,350], and (350,700] days. LVEF, LV mass index, and LV mass-to-volume were significantly below

their baseline averages during all follow-up periods after anthracyclines ($p < 0.01$; Figure 2 a, b, and d). In addition, we observed a significant increase of the T2-weighted signal intensity ratio (myocardium/skeletal muscle) during the 147-231 days follow-up period (Figure 2c). ECV increased approximately linearly from 0.32 ± 0.038 at baseline, by 0.037 (11%), to 0.36 ± 0.04 in the (350, 700] day period ($P = 0.0035$ for (350, 700] days vs. baseline) (Figure 3a). τ_{ic} , a non-invasive measure of cardiomyocyte size, averaged 169 ± 69 ms at baseline (“Pre-DOX”), and decreased after anthracycline (Figure 3b). The approximately 30% decrease of the τ_{ic} , and increase of ECV are consistent with the observed change of LV mass, as shown in the Appendix B. ECV and τ_{ic} changed approximately linearly with the number of days after anthracycline initiation, as shown in Figure 3c and d.

LV mass index was strongly associated with τ_{ic} ($\beta = 4.1 \pm 1.5$ g/m² per 100 ms increase in τ_{ic} ; $P = 0.007$), but not with ECV ($P = 0.16$). Radiotherapy was associated with worse LV remodeling, assessed by the LV mass/EDV ratio, within the (175, 418] days after anthracycline (estimate: -0.27 ± 0.12 ; $P = 0.023$), but had no significant effect on LVEF, ECV, and τ_{ic} .

Biochemical analysis

Serum biomarker results are summarized in Table 3 with further results in the Appendix. cTnT levels rose significantly from a pre- anthracycline level of 4.6 ± 1.4 pg/ml to 21.3 ± 14.4 pg/ml within the (79, 146] time period after anthracycline initiation ($P < 0.001$), and declined thereafter. The change of the serum biomarkers after anthracycline therapy was also analyzed using GAM's for the log-transformed biomarker level, with time from anthracycline initiation, represented by a cubic regression spline, as single predictor (see Figure 4a for cTnT). cTnT peaked at approximately 120 days after the beginning of anthracycline therapy. The peak cTnT level after anthracycline was determined for each patient, and ranged from 6

to 57 pg/ml (median peak cTnT = 14 pg/ml, inter-quartile range = 10.5 pg/ml). The 10-year risk for a CVD event (based on Framingham risk score) did not have a significant effect on the time-course of the cTnT response during and after anthracycline, as illustrated in Figure 4a. To investigate the effect of myocardial injury on cardiomyocytes, we estimated the LV cardiomyocyte mass (CM) from the product of (1-ECV), the intra-cellular volume fraction, and total LV mass. The cardiomyocyte mass index decreased after anthracycline initiation ($P < 0.001$; Fig. 4b), with a predicted decrease (LME model for CM with time period as single predictor) of -10.9 ± 1.1 for the 351-700 day range, from a baseline value of $34.7 \pm 5.4 \text{ ml/m}^2$, which corresponds to a net 31.4% decrease of CM index. The decrease of CM after anthracyclines was more pronounced in patients with a peak cTnT $> 10 \text{ pg/ml}$, a lower threshold for cTnT that was found to be associated with an increased risk of HF(15,16) (Figure 4b). Patients with a peak cTnT $> 10 \text{ pg/ml}$ did not have a significantly higher CVD event risk ($P = 0.49$ for two-sample Wilcoxon test). A similar analysis for LV mass showed a weaker effect for peak cTnT $> 10 \text{ pg/ml}$, suggesting that CM is more sensitive than total LV mass to myocardial injury after anthracycline therapy. The decline of LVEF appeared to peak approximately 100-150 days later than the cTnT (Figure 4a and c).

Predictors of LV Dysfunction Post Anthracycline

A cardiomyocyte size at baseline greater than its median value (median at baseline: 154 ms) was associated with more post- anthracycline LV systolic dysfunction than in patients with $\tau_{ic} > \text{median}$ at baseline (Figure 5). These differences in LVEF based on τ_{ic} at baseline occur during the follow-up periods when LVEF reaches a minimum, and shows a slight recovery, respectively. E.g. LVEF was $49 \pm 11\%$ during the (231,350] day follow-up period, in patients with τ_{ic} at baseline $> \text{median}$, compared to $57 \pm 6\%$ for patients with $\tau_{ic} \leq \text{median}$. A LME model for LVEF with factors for τ_{ic} at baseline $> \text{median}$, follow-up time period, and their interaction as predictors predicted that patients with $\tau_{ic} > \text{median}$ at baseline have a $9.3 \pm 3.6 \%$

lower EF at (231, 350] days ($P=0.013$ for interaction), and a $8.5\pm 3.5\%$ lower EF at (350, 700] days ($P=0.019$ for interaction), compared to the already significant decline of LVEF after anthracyclines ($P<0.002$ for all time periods) for patients with τ_{ic} at baseline \leq median. CRP at baseline $>$ median was significantly associated with the log-transformed T2-weighted SI ratio at (146,231] days post anthracycline (LME model estimate: $+0.36\pm 0.088$; $P=0.0002$) and after 350 days post anthracycline (estimate: -0.21 ± 0.09 ; $P=0.021$). CRP at baseline $>$ median was also associated with a higher rate of decline of τ_{ic} after anthracycline therapy (LME model estimate: -0.015 ± 0.0069 s change per 100 days; $P=0.039$ for interaction of time with CRP $>$ median in LME model for τ_{ic} with time, CRP $>$ median, and interaction as predictors). An LDL at baseline $>$ median value was significantly associated with the decline in systolic function within 231 to 350 days post anthracycline initiation (estimate: -0.08 ± 0.03 ; $P=0.029$), i.e. the period after anthracycline therapy when LVEF was lowest. Baseline LDL level $>$ median was associated with an overall higher ECV (0.03 ± 0.013 ; $P=0.024$ in LME model for ECV with time, LDL $>$ median, and interaction as predictors, $P=0.8$ for interaction). There was a trend for LVEF to be lower within 231-350 days post anthracycline initiation when leucocyte levels at baseline $>$ median (estimate: 0.07 ± 0.03 ; $P=0.07$). Baseline CRP levels were not associated with LVEF at any time before, during, or after anthracycline therapy. Both the Framingham 10-year risk for a CVD event and the age adjusted risk increment (i.e. risk increment compared to patients of same age and gender without other risk factors) were not significantly associated with LV remodeling after anthracycline therapy.

Discussion

The principal finding of our study is that previously reported functional and morphological changes of the LV post anthracycline-based chemotherapy (e.g., reduced LV mass) are characterized primarily by reduction in cardiomyocyte size, rather than increased myocardial fibrosis (by expansion of the interstitial space). LV atrophy and systolic dysfunction were

closely linked to markers of cardiac injury and systemic inflammation. The differential response of CMR markers of cardiomyocyte atrophy and extracellular remodeling support further investigation of the role for CMR-based tissue characterization in anthracycline-based chemotherapy surveillance. Our study also extends the longitudinal observation of LV remodeling and dysfunction by CMR from approximately 3 months in two previous landmark studies(17,18), to up to 2 years after anthracyclines, which revealed an association between LV atrophy and peak cTnT response.

In animal models of AIC, cardiomyocyte atrophy is coupled to increased oxidative stress, and is a central aspect of the underlying cardiac injury during an asymptomatic phase of 1-2 years after anthracycline treatment(19,20). Most previous work with CMR in patients has focused on the potential role of interstitial fibrosis and changes in morphology during anthracycline treatment(21-25). A reduction in LV mass following anthracycline-based chemotherapy has consistently been reported(26,27). The vast majority of these patients also have a small but significant reduction in LVEF and strain(23), which are associated with major adverse cardiac events (cardiovascular death, appropriate implantable cardioverter defibrillator therapy or admission for decompensated HF)(27). While LGE imaging is currently the technique of choice for detection of necrosis and fibrosis in AIC(21,28-31), LGE may be absent or offer only a partial quantification of the extent of myocardial involvement in incipient disease or in diffuse cardiac injury conditions. Interstitial myocardial fibrosis is commonly observed in experimental models of AIC and is a functional marker of disease in patients: ECV is an independent risk factor for reduced exercise capacity(25), heart failure and sudden death. Nevertheless, patient studies on the time-course of fibrosis and hypertrophy development during anthracycline exposure remain limited(17,32).

In this study, we recapitulated the reduction in LV mass after anthracycline and further

explored its cellular constitution, suggesting that decreased cardiomyocyte size (atrophy) may be a primary mechanism. While the loss of LV mass has been shown to be of strong prognostic value(27), the mechanism leading to LV atrophy in breast cancer patients has remained largely unclear. LV atrophy does not necessarily imply cardiomyocyte atrophy (e.g. from autophagy), as other mechanisms such as necrosis and apoptosis could also lead to a loss of cardiomyocyte mass, with potentially very different *therapeutic implications* for the treatment of AIC(33). The product of LV mass with (1-ECV), which corresponds approximately to the cardiomyocyte mass, could suggest a substantial loss of cardiomyocytes, if the cardiomyocyte size were to remain unchanged. Our results for τ_{ic} show that *cardiomyocyte-level* atrophy may play a significant effect in the reduction of total cardiomyocyte volume after anthracycline therapy. The change in τ_{ic} alone amounts to an approximately ~44% reduction in LV mass from cardiomyocyte atrophy (details provided in on-line Appendix B). The effect of cardiomyocyte atrophy on LV mass can be offset by expansion of the extracellular. Our estimate of an overall -31% change in LV mass, is in good agreement with the -27% change of LV mass measured by cine CMR. In a mouse colon-adenocarcinoma model, anthracycline caused a loss of cardiac mass due to a decrease in cardiomyocyte *size*, rather than cardiomyocyte *count*, that was associated with reduced levels of all sarcomeric proteins (34). There was no myocardial LGE in our patients, suggesting that replacement fibrosis likely had a relatively minor effect.

Our results improve the current mechanistic understanding of AIC, suggesting that these changes result from both cardiomyocyte atrophy and interstitial myocardial fibrosis. Similar findings have been reported in experimental studies with animals showing myocyte atrophy(4-6) to be related to LV mass reduction during anthracycline treatment.

Limitations

The present study evaluated a homogeneous group, therefore generalizability may be limited, and the results cannot be applied to patients with different clinical profile. Since our patients remained asymptomatic throughout the entire follow-up we could not show associations for ECV and τ_{ic} with clinical outcomes as in previous studies of patients with symptoms of cardiac dysfunction after anthracycline therapy. For the present study, we used a Look-Locker technique for T1 measurements rather than the more advanced modified Look-Locker imaging (MOLLI), as the CMR marker of cardiomyocyte size was originally validated using the Look-Locker technique(13).

Conclusion

BC patients undergoing anthracycline-therapy had significant reductions in LVEF and LV mass despite the absence of focal myocardial necrosis (i.e. LGE). LV atrophy could be primarily accounted for by a reduction in cardiomyocyte size, and the expansion of the extracellular space made a much smaller contribution to the observed change in LV mass. The loss of LV cardiomyocyte mass was associated with the observed changes in cardiac troponins after anthracycline therapy. Thus, CMR offers the potential to enhance the mechanistic understanding of LV remodeling in anthracycline-treated patients through assessment of both ECV and cardiomyocyte size.

Clinical Perspective

While anthracyclines persist as a main chemotherapeutic drug in several cancer treatment regimens, up to 50% of patients treated with anthracyclines will develop some degree of cardiac dysfunction after treatment. Although management of heart failure in AIC has improved, a better understanding and early detection of anthracycline-induced cardiotoxicity may facilitate and improve possible prevention and therapeutic interventions. In this study, using novel CMR makers for extracellular volume expansion and cardiomyocyte shrinkage, we demonstrated that myocardial tissue remodeling after anthracycline is predominantly associated with cardiomyocyte atrophy, compared to extracellular matrix (ECM) remodeling. The findings of this study suggest that cardiomyocyte atrophy, thought to be coupled to AIC-induced oxidative stress, is an early marker of anthracycline-induced cardiomyopathy, possibly preceding extensive ECM remodeling.

References

1. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 1998;339:900-5.
2. Swain SM. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 1999;340:654; author reply 655.
3. Aiken MJ, Suhag V, Garcia CA et al. Doxorubicin-induced cardiac toxicity and cardiac rest gated blood pool imaging. *Clinical nuclear medicine* 2009;34:762-7.
4. Zhu W, Shou W, Payne RM, Caldwell R, Field LJ. A mouse model for juvenile doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Pediatr Res* 2008;64:488-94.
5. Zhu W, Soonpaa MH, Chen H et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation* 2009;119:99-106.
6. Sturgeon K, Schadler K, Muthukumaran G et al. Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2014;307:R685-92.
7. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004;109:2749-54.
8. Coelho-Filho OR, Mongeon FP, Mitchell R et al. Role of transcytolemmal water-exchange in magnetic resonance measurements of diffuse myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation Cardiovascular imaging* 2013;6:134-41.
9. Neilan TG, Coelho-Filho OR, Shah RV et al. Myocardial extracellular volume fraction from T1 measurements in healthy volunteers and mice: relationship to aging and cardiac dimensions. *JACC Cardiovasc Imaging* 2013;6:672-83.
10. Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M et al. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:855-61.
11. Eitel I, Friedrich MG. T2-weighted cardiovascular magnetic resonance in acute cardiac disease. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2011;13:13.
12. Coelho-Filho OR, Shah RV, Mitchell R et al. Quantification of cardiomyocyte hypertrophy by cardiac magnetic resonance: implications for early cardiac remodeling. *Circulation* 2013;128:1225-33.
13. Landis CS, Li X, Telang FW et al. Equilibrium transcytolemmal water-exchange kinetics in skeletal muscle in vivo. *Magnetic resonance in medicine* 1999;42:467-78.
14. Wood SN. Generalized additive models : an introduction with R. Second edition. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.
15. Kitayama H, Kondo T, Sugiyama J et al. High-sensitive troponin T assay can predict anthracycline- and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Breast cancer* 2017.
16. Glazier JJ. Importance of troponin levels in the early detection of anthracycline-associated cardiomyopathy. *The American journal of medicine* 2011;124:e15; author reply e17.
17. Jordan JH, Vasu S, Morgan TM et al. Anthracycline-Associated T1 Mapping Characteristics Are Elevated Independent of the Presence of Cardiovascular Comorbidities in Cancer Survivors. *Circulation Cardiovascular imaging* 2016;9.

18. Melendez GC, Jordan JH, D'Agostino RB, Jr., Vasu S, Hamilton CA, Hundley WG. Progressive 3-Month Increase in LV Myocardial ECV After Anthracycline-Based Chemotherapy. *JACC Cardiovasc Imaging* 2017;10:708-709.
19. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine* 2012;18:1639-42.
20. Murphy KT. The pathogenesis and treatment of cardiac atrophy in cancer cachexia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2016;310:H466-77.
21. Ong DS, Scherrer-Crosbie M, Coelho-Filho O, Francis SA, Neilan TG. Imaging methods for detection of chemotherapy-associated cardiotoxicity and dysfunction. *Expert review of cardiovascular therapy* 2014;12:487-97.
22. Ylanen K, Poutanen T, Savikurki-Heikkila P, Rinta-Kiikka I, Eerola A, Vettenranta K. Cardiac magnetic resonance imaging in the evaluation of the late effects of anthracyclines among long-term survivors of childhood cancer. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;61:1539-47.
23. Drafts BC, Twomley KM, D'Agostino R, Jr. et al. Low to moderate dose anthracycline-based chemotherapy is associated with early noninvasive imaging evidence of subclinical cardiovascular disease. *JACC Cardiovasc Imaging* 2013;6:877-85.
24. Toro-Salazar OH, Gillan E, O'Loughlin MT et al. Occult cardiotoxicity in childhood cancer survivors exposed to anthracycline therapy. *Circulation Cardiovascular imaging* 2013;6:873-80.
25. Tham EB, Haykowsky MJ, Chow K et al. Diffuse myocardial fibrosis by T1-mapping in children with subclinical anthracycline cardiotoxicity: relationship to exercise capacity, cumulative dose and remodeling. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2013;15:48.
26. Armstrong GT, Plana JC, Zhang N et al. Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:2876-84.
27. Neilan TG, Coelho-Filho OR, Pena-Herrera D et al. Left ventricular mass in patients with a cardiomyopathy after treatment with anthracyclines. *Am J Cardiol* 2012;110:1679-86.
28. Kim RJ, Fieno DS, Parrish TB et al. Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation* 1999;100:1992-2002.
29. Harris PA, Lorenz CH, Holburn GE, Overholser KA. Regional measurement of the Gd-DTPA tissue partition coefficient in canine myocardium. *Magnetic resonance in medicine* 1997;38:541-5.
30. Flacke SJ, Fischer SE, Lorenz CH. Measurement of the gadopentetate dimeglumine partition coefficient in human myocardium in vivo: normal distribution and elevation in acute and chronic infarction. *Radiology* 2001;218:703-10.
31. Elliott P. Pathogenesis of cardiotoxicity induced by anthracyclines. *Seminars in oncology* 2006;33:S2-7.
32. Neilan TG, Coelho-Filho OR, Shah RV et al. Myocardial extracellular volume by cardiac magnetic resonance imaging in patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Am J Cardiol* 2013;111:717-22.

33. Liu Z, He K, Ma Q et al. Autophagy inhibitor facilitates gefitinib sensitivity in vitro and in vivo by activating mitochondrial apoptosis in triple negative breast cancer. PloS one 2017;12:e0177694.
34. Cosper PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. Cancer research 2011;71:1710-20.

Figure legends

Figure 1 – Study timeline: Timeline for follow-up of patients who were consecutively enrolled if they had received a breast-cancer diagnosis and had planned adjuvant anthracycline-therapy (4-cycles of 60 mg/m²). Clinical assessment and CMR were performed before and up to three times serially after the anthracycline treatment. Biomarker collection was performed at the time of each CMR, and before each anthracycline administration during clinic visits 1, 2 and 3.

Figure 2 A-D – Baseline and post- anthracycline LVEF, LV mass-index, T2-weighted and LV mass-to-volume: (A) LVEF and LV mass-index (B) were significantly lower in all four-time intervals (quartiles for follow-up time) after anthracycline therapy ($P < 0.001$ for A and B). (C) The T2-weighted signal intensity ratio (myocardium/skeletal muscle) was significantly higher in the 2nd quartile of the follow-up time (146-231 days) compared to baseline ($P < 0.001$), and tended to normalize later. The horizontal dashed line corresponds to a T2-weighted signal intensity ratio of 2:1, a threshold for the diagnosis of myocardial edema. (D) LV mass-to-volume (ED) after anthracycline therapy was below its baseline level for all time periods shown ($P < 0.001$). The estimated changes for these CMR parameters relative to baseline, and their P-values were obtained from linear mixed effects models, and are shown for significant changes above or below the boxes and whiskers.

Figure 3 (A and B) – Baseline and post- anthracycline ECV and τ_{ic} : ECV increased (A) and the intra-cellular lifetime, τ_{ic} , declined (B) after anthracycline. P-values in (A) and (B) are for the fixed effect of follow-up time period (in quartiles) vs. baseline in linear mixed effects models for ECV, and τ_{ic} , respectively. **(C and D)** ECV and τ_{ic} changed approximately linearly with time. The lines, gray-shaded 95th percentile prediction ranges, and P-values in (C) and (D) were obtained from linear mixed effects models for ECV and τ_{ic} with time (continuous)

as single fixed effect.

Figure 4 (A, B and C) – cTnT, LV cardiomyocyte mass and LVEF during the study (Central Illustration): **A)** cTnT changed significantly ($P < 1e-10$) between the first baseline measurement to the end of the follow-up period, with cTnT peaking at approximately at ~120 days after anthracycline initiation (approx. 50 days after last anthracycline infusion). The solid lines (blue for patients with Framingham 10-year risk for a CVD event (FR) $>$ median and red for patients with FR \leq median) represent the predictions from a generalized additive model (GAM) for cTnT (log-transformed) with a cubic regression spline for time as single predictor. The gray-shaded area around the red and blue lines represent the 95th percentile range for the GAM prediction. **B)** The loss of cardiomyocyte mass (CM) after anthracycline therapy was associated with the peak cTnT observed in each patient. The continuous red and blue lines represent the predicted change of CM, corresponding to patients with peak cTnT $<$ 10 pg/ml, and \geq 10 pg/ml, respectively. The change with time was highly significant in both cases ($P < 1e-9$). With peak cTnT $>$ 10 pg/ml (red line), the loss of CM appears to be accelerated compared to the blue line over a time span of approximately 100-400 days after anthracycline initiation. **C)** Systolic dysfunction, assessed by LVEF, declined after anthracycline therapy, with a relatively broad minimum for LVEF centered around 300 days post anthracycline initiation and occurring after cTnT had peaked at ~120 days. The solid line represents the prediction from a GAM for LV EF vs. time ($P < 0.001$), with the 95th percentile range shown in light gray. Peak cTnT had no significant effect on LVEF in (C).

Figure 5 – Baseline cardiomyocyte size and LV systolic dysfunction post- anthracycline:

There was a significant decline of LVEF in both subgroups after anthracyclines ($P \leq 0.001$). Patients with $\tau_{ic} >$ median at baseline showed a further 9.3 ± 3.6 % decline of LVEF at (231, 350] days ($P = 0.013$), and of 8.5 ± 3.5 % at (350, 700] days ($P = 0.019$), compared to patients

with an τ_{ic} at baseline < median. P-values are for coefficient estimates in linear mixed effects model for LVEF with cardiomyocyte-size > median, follow-up time period, and their interaction as (fixed-effects) predictors.

Tables:

Online Table 1: Days from Baseline and Follow-up CMR studies (online-only Data Supplement)

		Baseline CMR	Visit #1 CMR	Visit # 2 CMR	Visit # 3 CMR
Days from		-12 – 0	79 – 271	175 – 418	275 - 700
baseline visit for					
anthracycline					
N		27	17	20	17

Table 1. General characteristics

Demographics and clinical data at baseline	
Age	51.8±8.9
Body mass index, kg/m ²	26.9±3.6
Body surface area, m ²	1.8±0.1
Heart rate	72.2±11.4
Hypertension, %, (N)	22.2(6)
Diabetes, %, (N)	0(0)
Hyperlipidemia, % (N)	14.8(4)
Tobacco current use, %, (N)	22.2(6)
Former smoker, %, (N)	11.1(3)
The Framingham 10-year risk for a CVD event, % (range).	5 (1.4 – 21.1)
The Framingham age adjusted risk increment, % (range).	2.9 (0-17.7)
Medication use	
Angiotensin-converting enzyme inhibitor, %, (N)	14.8(4)
Aspirin, %, (N)	3.7(1)
β -Blocker, %, (N)	3.7(1)
Statin, %, (N)	14.8(4)
Metformin, %, (N)	0(0)
Insulin, %, (N)	0(0)
Laboratory analyses	
HDL-cholesterol, mg/dL	59.2±14.9
LDL-cholesterol, mg/dL	144.2±28.3
Triglycerides, mg/dL	120.3±34.9
CRP levels, mg/L	0.3±0.2
Glucose, mg/dL	89.2±12.9
Glycated Hemoglobin, %	5.5±0.3
White blood cells, 10 ³ /mm ³	6.1±0.9
Glomerular Filtration Rate, ml/min	125.4± 35.3

Data are presented as mean ± SD, n (%) or median (range) when appropriated.

Table 2. Baseline and Follow-Up CMR Findings

Median days after anthracycline	Pre-DOX	(79,146]	(146,231]	(231,350]	(350,700]
N	27	16	19	14	16
LVEF, %	69.4 ± 3.6	61.1 ± 7.6 &	55.99 ± 5.0 &	53.8 ± 8.4 &	57.5 ± 6.1 &
LVEDV index, ml/m ²	60.2 ± 9.9	64.3 ± 9.6	66.7 ± 17.7 *	56.9 ± 18.5	59.2 ± 12.6
LVESV index, ml/m ²	18.3 ± 4.0	24.7 ± 7.3 #	29.0 ± 7.3 &	26.2 ± 9.7 &	25.3 ± 8.2 &
LV mass index, g/m ²	51.4 ± 8.0	45.3 ± 3.8 &	43.2 ± 4.9 &	39.9 ± 5.4 &	36.0 ± 6.1 &
LV mass/volume	0.86 ± 0.15	0.70 ± 0.12 #	0.68 ± 0.18 &	0.75 ± 0.28 #	0.61 ± 0.13 &
LA volume index, ml/m ²	30.5 ± 8.3	32.0 ± 5.6	33.3 ± 9.0	33.5 ± 8.4 *	35.8 ± 8.6 *

Data are presented as mean ± SD. LVEF: left ventricular ejection fraction LVEDV: left ventricle end diastolic volume; LVESV: left ventricle end systolic volume LV: left ventricle; LA: left atrium (average/SD).

*Significantly different from Pre-DOX level (p<0.05 from linear mixed effects model).

Significantly different from Pre-DOX level (p<0.01 from linear mixed effects model).

& Significantly different from Pre-DOX level (p<0.001 from linear mixed effects model).

Table 3. Baseline and Follow-Up Biochemical Analysis

Median days after anthracycline	Pre-DOX	(79,146]	(146,231]	(231,350]	(350,700]
N	27	16	19	14	16
CK MB fraction, U/L	13.6 ± 6.1	19.8 ± 11.7 *	19.1 ± 8.5 *	15.8 ± 8.5	17.2 ± 7.8
hs-CRP, mg/L	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.2	0.12 ± 0.7 *	0.3 ± 0.4
hs-Troponin T, ng/dL	4.6 ± 1.4	21.3 ± 14.4 *	10.7 ± 3.2 *	6.6 ± 3.7 *	5.2 ± 1.6
Hemoglobin, g/dL	13.1 ± 0.9	12.1 ± 1.0 *	12.1 ± 1.0 *	12.1 ± 0.8 *	12.1 ± 1.0 *
Hematocrit, %	39.8 ± 2.5	36.4 ± 2.8 *	36.5 ± 2.8 *	36.1 ± 2.6 *	37.1 ± 2.8 *

Data are presented as mean ± SD. CK: Creatine kinase; CRP: C Reactive Protein; hs: high-sensitivity; (average/SD).

*Significantly different from Pre-DOX level (p<0.01 from linear mixed effects model).

Figures

Figure 1:

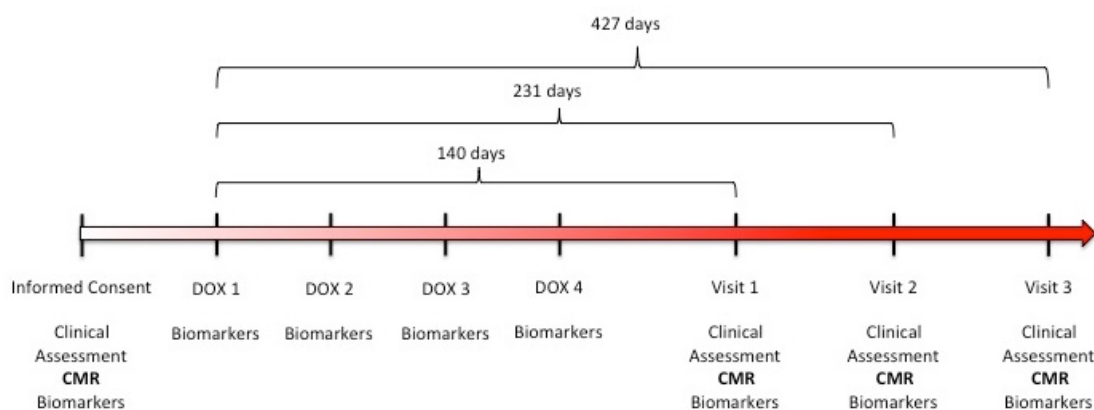


Figure 2 (A-D):

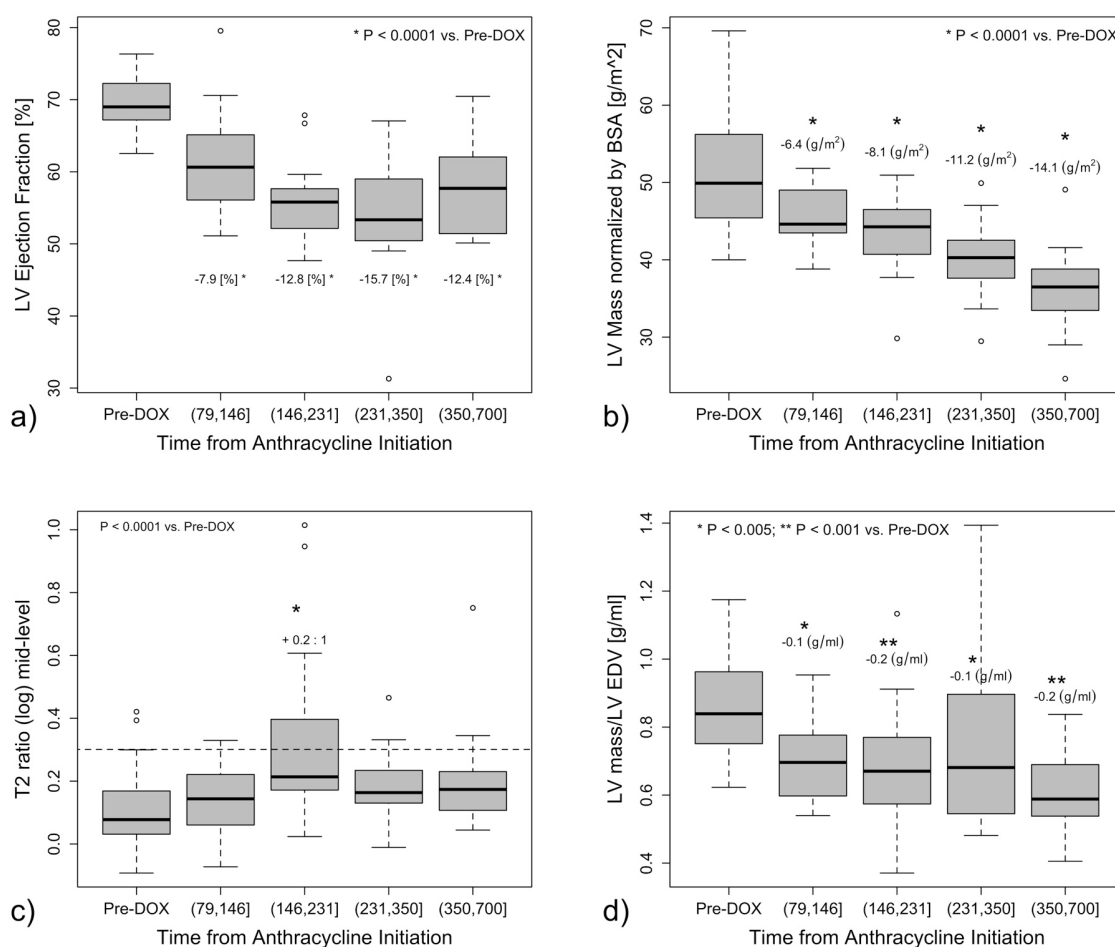


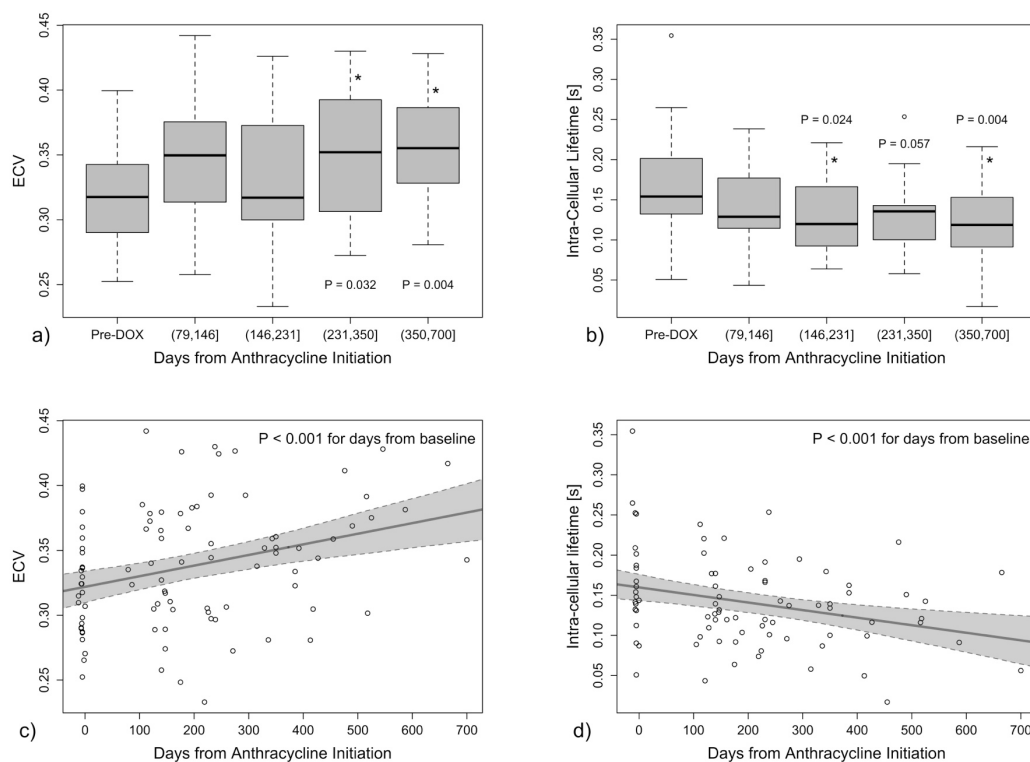
Figure 3 (A-D):

Figure 4 (A, B and C) (Central Illustration):

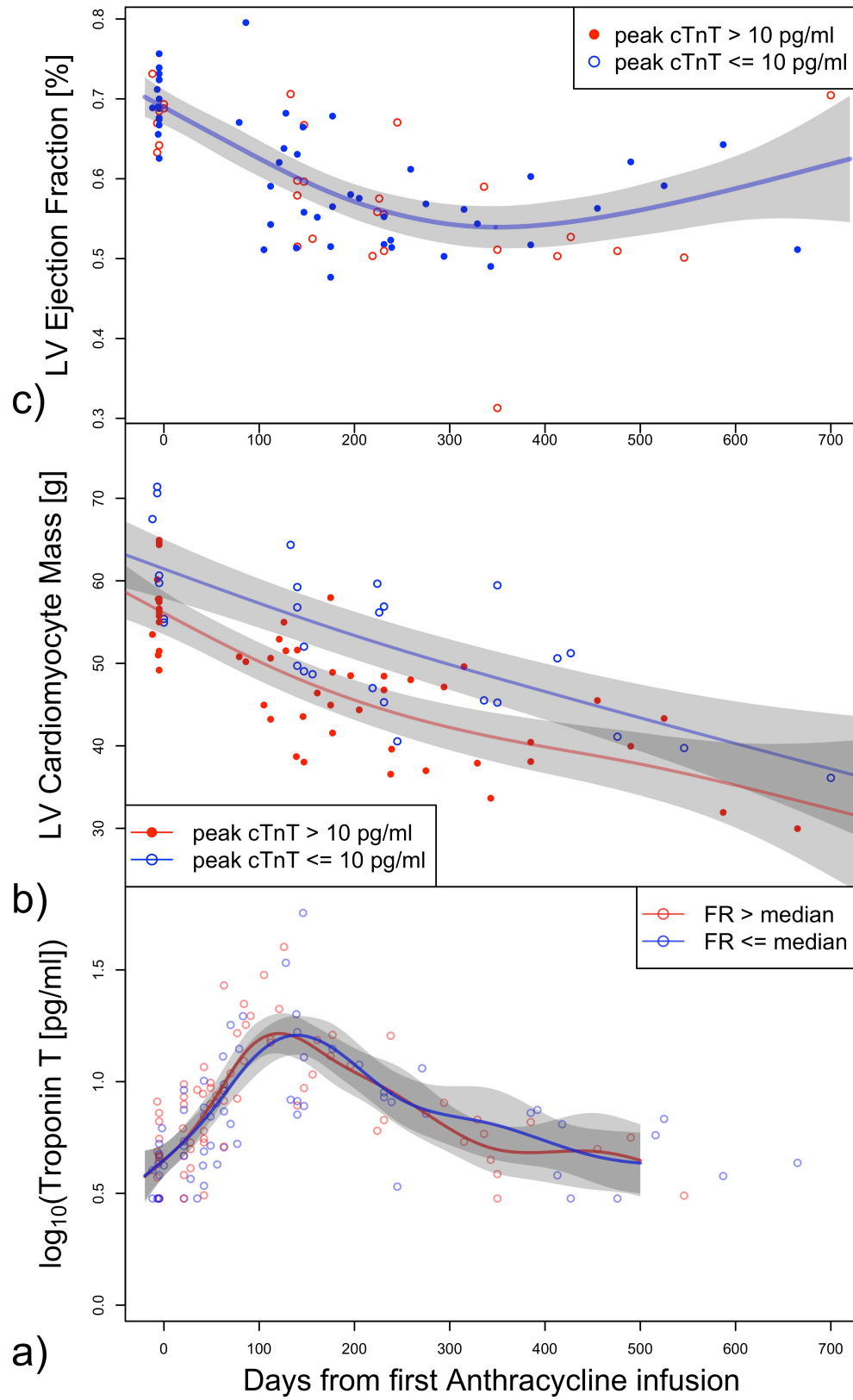
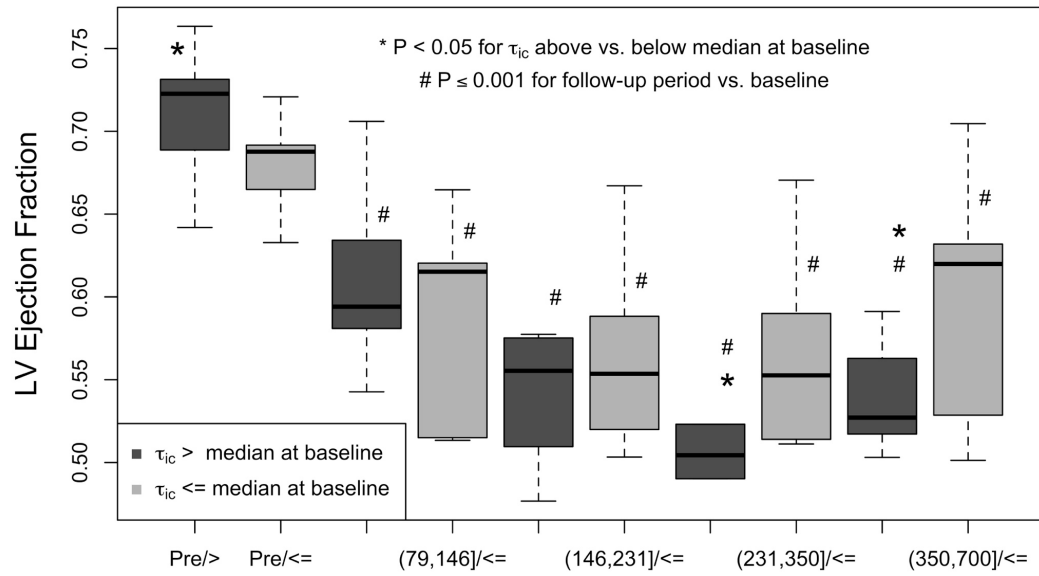


Figure 5:

5. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que as alterações morfológicas e funcionais do VE previamente descritas em pacientes que receberam quimioterapia com antraciclina, como a redução da massa do VE, são principalmente devido a redução do tamanho do cardiomiócito, ao invés do aumento da fibrose intersticial. A atrofia e disfunção sistólica do VE estão intimamente ligadas a marcadores de lesão miocárdica e inflamação sistêmica. Esta resposta diferencial dada pelos marcadores de atrofia do cardiomiócito e remodelamento extracelular obtidos pela RMC suportam a necessidade de mais investigação do papel da caracterização tecidual pela RMC no grupo de pacientes tratados com antraciclina. Nosso estudo também estende a observação longitudinal do remodelamento e disfunção do VE através da RMC de aproximadamente 3 meses em dois estudos marcantes prévios^{52,53}, para até 2 anos após a quimioterapia, o que revelou a associação entre atrofia do VE e os valores máximos de cTnT.

Grande parte das publicações com RMC em pacientes tratados com antraciclina focaram no papel potencial da mudança morfológica e da fibrose intersticial miocárdica⁵⁴⁻⁵⁸, com resultados consistentes de redução da massa do VE e da FEVE^{56,59,60}. Fibrose intersticial miocárdica é comumente observada em modelos experimentais de cardiotoxicidade induzida por antraciclina, e é um marcador funcional de doença em pacientes, pois o VEC é um fator de risco independente para redução da capacidade de exercício⁵⁸, insuficiência cardíaca²⁹ e morte súbita²⁸.

Neste estudo foi explorada a redução da massa do VE após antraciclina, incluindo sua constituição celular, que sugere ser a redução no tamanho do cardiomiócito o principal mecanismo responsável. Enquanto a perda da massa do VE se mostrou de alto valor prognóstico⁶⁰, o mecanismo que leva a atrofia do VE em pacientes com câncer da mama permanece incerto. A atrofia do VE não necessariamente implica em atrofia dos cardiomiócitos, já que outros mecanismos como necrose e apoptose podem levar a perda da massa de cardiomiócitos, com consequente perda de massa no miocárdio, à medida que os cardiomiócitos são substituídos por fibrose, com implicações terapêuticas potencialmente muito diferentes para o tratamento de CIA⁶¹. O produto da massa do VE com (1-VEC), que corresponde aproximadamente à massa de cardiomiócitos, poderia sugerir uma perda substancial de cardiomiócitos, se o tamanho dos cardiomiócitos não se modificasse. Porém os achados de τ_{ic} demonstram que a redução no tamanho do cardiomiócito tem um efeito significativo na redução do volume total dos cardiomiócitos após a terapia com antraciclina.

Baseado apenas na mudança do τ_{ic} , se pode esperar uma redução de cerca de 44% na massa do VE secundária unicamente à atrofia dos cardiomiócitos. O efeito da atrofia dos cardiomiócitos na massa do VE pode ser contrabalanceado pela expansão do espaço extracelular. O aumento do VEC observado neste estudo pode ser traduzido como um aumento aproximado de 13% na massa do VE, sugerindo uma redução total na massa do VE da ordem de 31%, enquanto que a mudança na massa do VE medida pela sequências em cine da RMC evidenciou uma redução de 27%. O resultado demonstra que a perda de cardiomiócitos parece ter um efeito menor, já que as mudanças observadas no τ_{ic} e no VEC, sem considerar mudanças na contagem de cardiomiócitos, estão em concordância com a mudança na massa do VE. Em um modelo de adenocarcinoma de cólon em rato, ao invés da redução na contagem dos cardiomiócitos, o câncer causou perda da massa cardíaca secundária a redução do tamanho do cardiomiócito e dos níveis de todas as proteínas sarcoméricas⁶². Não se identificou RT nesse grupo de pacientes, corroborando a interpretação de que o aumento da fibrose tem um efeito relativo menor.

Os resultados aumentam a compreensão da CIA, sugerindo que suas alterações ocorrem como resultado de atrofia do cardiomiócito e de fibrose intersticial do miocárdio. Resultados semelhantes foram descritos em estudos experimentais com animais que demonstraram que a atrofia dos cardiomiócitos está relacionada à redução da massa do VE durante o tratamento com antraciclina⁴²⁻⁴⁴. Estes estudos evidenciaram aumento na fibrose seguindo apoptose dos miócitos na fase de recuperação após a quimioterapia.

5.1. Perspectiva clínica

Enquanto as antraciclina persistem como principal classe de quimioterápicos no tratamento de diversos tipos de neoplasias, muitos pacientes irão desenvolver algum grau de disfunção cardíaca após o tratamento. Apesar da melhora no manejo da insuficiência cardíaca secundária a CIA, a maior compreensão e a detecção precoce da cardiotoxicidade induzida por antraciclina pode facilitar e melhorar uma possível intervenção preventiva e terapêutica. Neste estudo, utilizando novos marcadores de remodelamento miocárdico derivados da RMC, incluindo o volume extracelular – marcador da fibrose intersticial – e o tempo de vida intracelular da água – marcador do tamanho do cardiomiócito – foi demonstrado que o remodelamento miocárdico após o uso de antraciclina está predominantemente associado à atrofia dos cardiomiócitos, quando comparado ao aumento da matriz extracelular. Destaca-se que os efeitos da CIA e o remodelamento da matriz extracelular podem ser atenuados por uma terapia para insuficiência cardíaca, com administração de inibidores do sistema renina-

angiotensina-aldosterona e betabloqueadores. Estes resultados sugerem que a atrofia dos cardiomiócitos, associada ao estresse oxidativo causado pelas antraciclinas, é um marcador precoce da cardiomiopatia induzida por antraciclinas, possivelmente precedendo o remodelamento extensivo da matriz extracelular.

5.2. Limitações

O trabalho avaliou uma população homogênea, portanto uma das limitações é que estes resultados não podem ser aplicados a pacientes com outros perfis. Além disso, como os pacientes permaneceram assintomáticos durante todo o seguimento, não foi possível fazer associações do VEC e do τ_{ic} com desfecho clínico. Foi também utilizada a sequência Look-Locker para quantificação do T1 ao invés de técnicas modernas, como sequências MOLLI, pois os marcadores de tamanho do cardiomiócito foram originalmente validados com a sequência Look-Locker⁴⁰.

6. CONCLUSÃO

i. Pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia com antraciclina apresentaram redução significativa na FEVE e massa do VE apesar da ausência de RT.

ii. A atrofia do VE teve como principal causa a redução do tamanho do cardiomiócito, com uma pequena contribuição da expansão do VEC.

iii. A perda na massa de cardiomiócitos foi associada com mudanças observadas na quantificação da troponina após a quimioterapia.

iv. Portanto a RMC oferece o potencial de clarear o entendimento do remodelamento do VE em pacientes tratados com quimioterápicos derivados da antraciclina através da avaliação do VEC e do tamanho do cardiomiócito.

7. REFERÊNCIAS

- 1 Autier P, Boniol M, La Vecchia C, Vatten L, Gavin A, Héry C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ* 2010;341:c3620.
- 2 Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation* 2004;109:3122-31.
- 3 Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2231-47.
- 4 Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:7685-96.
- 5 Bates SE, Rosing DR, Fojo T, Piekarz RL. Challenges of evaluating the cardiac effects of anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2006;12:3871-4.
- 6 Swain SM. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1999;340:654; author reply 5.
- 7 Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002; 20(5):1215-21.
- 8 Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004;109:2749-54.
- 9 Ewer MS, Ali MK, Mackay B, Wallace S, Valdivieso M, Legha SS, et al. A comparison of cardiac biopsy grades and ejection fraction estimations in patients receiving Adriamycin. *J Clin Oncol* 1984;2(2):112-17.
- 10 Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991;324(12):808-15.
- 11 Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA* 1991;266(12):1672-7.
- 12 Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003;97:2869-79.
- 13 Ewer MS, O'Shaughnessy JA. Cardiac toxicity of trastuzumab-related regimens in HER2-overexpressing breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2007;7:600-7.

- 14 Perez EA. Cardiac toxicity of ErbB2-targeted therapies: what do we know? Clin Breast Cancer 2008;8 Suppl 3:S114-20.
- 15 Chien AJ, Rugo HS. The cardiac safety of trastuzumab in the treatment of breast cancer. Expert Opin Drug Saf;9:335-46.
- 16 Meinardi MT, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. Cancer Treat Rev. 1999;25(4):237-47.
- 17 Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. Circulation 2000;102:2105-10.
- 18 Seifert CF, Nesser ME, Thompson DF. Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Ann Pharmacother.1994;28(9):1063-72.
- 19 Elliott P. Pathogenesis of cardiotoxicity induced by anthracyclines. Semin Oncol 2006;33:S2-7.
- 20 Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. FASEB J 1997;11:931-6.
- 21 Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, De Giacomo G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. J Am Coll Cardiol 2010;55(3):213-20.
- 22 Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parker MA, Simonetti O, et al. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. NEnglJMed 2000;343:1445-53.
- 23 Kim RJ, Fieno DS, Parrish TB, Harris K, Chen EL, Simonetti O, et al. Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. Circulation 1999;100:1992-2002.
- 24 Tandri H, Saranathan M, Rodriguez ER, Martinez C, Bomma C, Nasir K, et al. Noninvasive detection of myocardial fibrosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy using delayed-enhancement magnetic resonance imaging. J Am Coll Cardiol 2005;45:98-103.
- 25 Hunold P, Wieneke H, Bruder O, Krueger U, Schlosser T, Erbel R, et al. Late enhancement: a new feature in MRI of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy? J Cardiovasc Magn Reson 2005;7:649-55.
- 26 Harris PA, Lorenz CH, Holburn GE, Overholser KA. Regional measurement of the Gd-DTPA tissue partition coefficient in canine myocardium. Magn Reson Med 1997;38:541-5.

- 27 Flacke SJ, Fischer SE, Lorenz CH. Measurement of the gadopentetate dimeglumine partition coefficient in human myocardium in vivo: normal distribution and elevation in acute and chronic infarction. *Radiology* 2001;218:703-10.
- 28 Iles L, Pfluger H, Phrommintikul A, Cherayath J, Aksit P, Gupta SN, et al. Evaluation of diffuse myocardial fibrosis in heart failure with cardiac magnetic resonance contrast-enhanced T1 mapping. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1574-80.
- 29 Ellinor PT, Sasse-Klaassen S, Probst S, Gerull B, Shin JT, Toepfel A, et al. A novel locus for dilated cardiomyopathy, diffuse myocardial fibrosis, and sudden death on chromosome 10q25-26. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:106-11.
- 30 Kehr E, Sono M, Chugh SS, Jerosch-Herold M. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging for detection and quantification of fibrosis in human myocardium in vitro. *Int J Cardiovasc Imaging* 2008;24:61-8.
- 31 Flett AS, Hayward MP, Ashworth MT, Hansen MS, Taylor AM, Elliott PM, et al. Equilibrium contrast cardiovascular magnetic resonance for the measurement of diffuse myocardial fibrosis: preliminary validation in humans. *Circulation* 2010;122:138-44.
- 32 Mongeon FP, Jerosch-Herold M, Coelho-Filho OR, Blankstein R, Falk RH, Kwong RY. Quantification of extracellular matrix expansion by CMR in infiltrative heart disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012 Sep;5(9):897-907.
- 33 Neilan TG, Coelho-Filho OR, Shah RV, Feng JH, Pena-Herrera D, Mandry D, et al. Myocardial Extracellular Volume by Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients Treated With Anthracycline-Based Chemotherapy. *Am J Cardiol* 2012 Dec 7.
- 34 Friedrich MG. There is more than shape and function. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1581-3.
- 35 Thornhill RE, Prato FS, Wisenberg G, White JA, Nowell J, Sauer A. Feasibility of the single-bolus strategy for measuring the partition coefficient of Gd-DTPA in patients with myocardial infarction: independence of image delay time and maturity of scar. *Magn Reson Med* 2006;55:780-9.
- 36 Pereira RS, Prato FS, Wisenberg G, Sykes J. The determination of myocardial viability using Gd-DTPA in a canine model of acute myocardial ischemia and reperfusion. *Magn Reson Med* 1996;36:684-93.
- 37 Lekx KS, Prato FS, Sykes J, Wisenberg G. The partition coefficient of Gd-DTPA reflects maintained tissue viability in a canine model of chronic significant coronary stenosis. *J Cardiovasc Magn Reson* 2004;6:33-42.
- 38 Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte

hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol*. 1986 Dec;8(6):1441-8.

39 Kajstura J, Zhang X, Reiss K, Szoke E, Li P, Lagrasta C, Cheng W, Darzynkiewicz Z, Olivetti G, Anversa P. Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. *Circ Res*. 1994 Mar;74(3):383-400.

40 Landis CS, Li X, Telang FW, Molina PE, Palyka I, Vetek G, et al. Equilibrium transcytolemmal water-exchange kinetics in skeletal muscle in vivo. *Magnetic resonance in medicine* 1999;42:467-78.

41 Pais A. "Subtle is the Lord-- " : the science and the life of Albert Einstein. Oxford Oxfordshire ; New York: Oxford University Press; 1982.

42 Zhu W, Shou W, Payne RM, Caldwell R, Field LJ. A mouse model for juvenile doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Pediatr Res* 2008;64:488-94.

43 ZhuW, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of paramycin pathway. *Circulation* 2009;119:99-106.

44 Sturgeon K, Schadler K, Muthukumaran G, Ding D, Bajulaiye A, Thomas NJ, et al. Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise. *American journal of physiology regulatory, integrative and comparative physiology* 2014;307:R685-92.

45 Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M, Casey SA, Panse N, Weil J, et al. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:855-61.

46 Eitel I, Friedrich MG. T2-weighted cardiovascular magnetic resonance in acute cardiac disease. *Journal of cardiovascular magnetic resonance: official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2011;13:13.

47 Coelho-Filho OR, Mongeon FP, Mitchell R, Moreno H, Nadruz W, Kwong R, et al. Role of transcytolemmal water-exchange in magnetic resonance measurements of diffuse myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation Cardiovascular imaging* 2013;6:134-41.

48 Coelho-Filho OR, Shah RV, Mitchell R, Neilan TG, Moreno H Jr, Simonson B, et al. Quantification of cardiomyocyte hypertrophy by cardiac magnetic resonance: implications for early cardiac remodeling. *Circulation* 2013;128:1225-33.

49 Kitayama H, Kondo T, Sugiyama J, Kurimoto K, Nishino Y, Kawada M, et al. High-sensitive troponin T assay can predict anthracycline- and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Breast cancer* 2017.

- 50 Kang Y, Xu X, Cheng L, Li L, Sun M, Chen H, et al. Two-dimensional speckle tracking echocardiography combined with high-sensitive cardiac troponin T in early detection and prediction of cardiotoxicity during epirubicine-based chemotherapy. *European journal of heart failure* 2014;16:300-8.
- 51 Glazier JJ. Importance of troponin levels in the early detection of anthracycline-associated cardiomyopathy. *The American journal of medicine* 2011;124:e15; author reply e17.
- 52 Jordan JH, Vasu S, Morgan TM, D'Agostino RB Jr, Meléndez GC, Hamilton CA, et al. Anthracycline-Associated T1 Mapping Characteristics Are Elevated Independent of the Presence of Cardiovascular Comorbidities in Cancer Survivors. *Circulation Cardiovascular imaging* 2016;9.
- 53 Melendez GC, Jordan JH, D'Agostino RB, Jr., Vasu S, Hamilton CA, Hundley WG. Progressive 3-Month Increase in LV Myocardial ECV After Anthracycline-Based Chemotherapy. *JACC Cardiovasc Imaging* 2017;10:708-709.
- 54 Ong DS, Scherrer-Crosbie M, Coelho-Filho O, Francis SA, Neilan TG. Imaging methods for detection of chemotherapy-associated cardiotoxicity and dysfunction. *Expert review of cardiovascular therapy* 2014;12:487-97.
- 55 Ylanen K, Poutanen T, Savikurki-Heikkila P, Rinta-Kiikka I, Eerola A, Vettenranta K. Cardiac magnetic resonance imaging in the evaluation of the late effects of anthracyclines among long-term survivors of childhood cancer. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;61:1539-47.
- 56 Drafts BC, Twomley KM, D'Agostino R Jr, Lawrence J, Avis N, Ellis LR, et al. Low to moderate dose anthracycline-based chemotherapy is associated with early noninvasive imaging evidence of subclinical cardiovascular disease. *JACC Cardiovasc Imaging* 2013;6:877-85.
- 57 Toro-Salazar OH, Gillan E, O'Loughlin MT, Burke GS, Ferranti J, Stainsby J, et al. Occult cardiotoxicity in childhood cancer survivors exposed to anthracycline therapy. *Circulation Cardiovascular imaging* 2013;6:873-80.
- 58 Tham EB, Haykowsky MJ, Chow K, Spavor M, Kaneko S, Khoo NS, et al. Diffuse myocardial fibrosis by T1-mapping in children with subclinical anthracycline cardiotoxicity: relationship to exercise capacity, cumulative dose and remodeling. *Journal of cardiovascular magnetic resonance: official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2013;15:48.
- 59 Armstrong GT, Plana JC, Zhang N, Srivastana D, Green DM, Ness KK, et al.

Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:2876-84.

60 Neilan TG, Coelho-Filho OR, Pena-Herrera D, Shah RV, Jerosch-Herold M, Francis SA, et al. Left ventricular mass in patients with a cardiomyopathy after treatment with anthracyclines. *Am J Cardiol* 2012;110:1679-86.

61 Liu Z, He K, Ma Q, Yu Q, Liu C, Ndege I, et al. Autophagy inhibitor facilitates gefitinib sensitivity in vitro and in vivo by activating mitochondrial apoptosis in triple negative breast cancer. *PloS one* 2017;12:e0177694.

62 Cosper PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer research* 2011;71:1710-20.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 30/08/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 752/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0675.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO PELA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE 3.0T DO REMODELAMENTO CARDÍACO SECUNDÁRIO AO USO DE QUIMIOTERÁPICOS DERIVADOS DA ANTRACICLINA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Otávio Rizzi Coelho

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 18/07/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 30/08/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Quantificar a fração do volume extracelular do miocárdio, através de um novo método oriundo da RMC, em pacientes submetidos a terapia com drogas quimioterápicas do grupo da antraciclina. Correlacionar a medida de index de fibrose com os valores de marcadores clássicos de lesão miocárdica com troponina ultra sensível.

III – SUMÁRIO.

Cerca de 100 pacientes serão selecionados. Realizarão exame de ressonância magnética em dois tempos: antes de serem submetidos ao tratamento quimioterápico com derivados de antraciclina para obtenção dos dados basais depois de 3 meses do final do tratamento. Uma amostra de sangue periférico será colhida no mesmo dia dos exames de RMC e após 1 semana do término do tratamento quimioterápico para dosagem de hematócrito, troponina ultra sensível, BNP e pro-colágeno tipo I e III. Segundo a rotina do serviço, serão submetidos a estudo de eletrocardiograma de 12 derivações em repouso e a ecocardiograma com Doppler tecidual antes do início do tratamento e 3 meses após o término.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU A SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE
A PESQUISA

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação Pela Ressonância Magnética de 3.0T do
Remodelamento Cardíaco Secundário ao Uso de Quimioterápicos Derivados da Adriamicina

PESQUISADORES: Prof Dr Otavio Rizzi Coelho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor, disciplina de Cardiologia, Departamento de Clínica Médica,
UNICAMP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA 18460 / SP

PESQUISADORES: Dr Thiago Ferreira de Souza

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente do Serviço de Medicina Nuclear do Departamento de Radiologia,
UNICAMP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA 135220 / SP

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:.....

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

O Sr.(a) está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa médica. O seu médico determinou que o Sr.(a) irá receber tratamento medicamentoso com drogas quimioterápicas que atuam e tratam diversos tipos de tumores e doenças neoplásica. Apesar das drogas quimioterápicas serem um tratamento muito eficaz e padronizado para vários tipos de câncer, estas medicações podem causar redução da função de bomba do coração, causando em alguns casos insuficiência cardíaca e falta de ar. Felizmente a grande maioria dos pacientes que recebem tratamento com

quimioterápicos, como o que o Sr (a) irá receber, não apresenta qualquer tipo de problema no coração, sendo que os problemas sérios no coração são muito raros. Até o momento não existem exames de imagem capazes de avaliar os pacientes que estão com maior ou menor risco de apresentar diminuição da função do coração com o tratamento com quimioterápicos. Mais recentemente a ressonância Magnética do coração se mostrou capaz de avaliar a função do coração melhor do qualquer outro método e nesse estudo queremos avaliar se a ressonância magnética consegue avaliar as mudanças no coração após tratamento com os remédios quimioterápicos.

Dessa forma o estudo que o Sr(a) está sendo oferecido a participar envolve a realização de dois exames de ressonância Magnética do coração (um antes e outro depois da tratamento com quimioterápicos), para termos mais informação de como o coração do Sr (a) irão se comportar com o tratamento de quimioterapia. Caso o Sr (a) aceite participar desse estudo, será realizado um exame de ressonância magnética antes de iniciar o tratamento e no fim do tratamento. Também iremos coletar uma pequena quantidade de sangue de uma veia do seu braço no início e no fim do tratamento para fazermos alguns exames de sangue que também podem ajudar entender quais pacientes tem risco de desenvolver piora da função do coração com tratamento que o Sr(a) irão receber contra o câncer. Além disso pretendemos fazer algumas perguntas a respeito dos medicamento que o Sr (a) usa e dos problemas de saúde que o Sr(a) já tiveram.

O exame de ressonância magnética do coração é extremamente seguro e já vem sendo usado todos os dias em muitos hospitais do Brasil e do mundo. Nesse exame é necessário conectar um equipo de injeção, semelhante aos equipos de soro, em uma veia do seu braço com a ajuda de uma punção com agulha. Esse equipo de injeção será utilizado para administrar o contraste da ressonância, chamado de gadolínio. Esse contraste é considerado o mais seguro de todos os contraste, sendo que os problemas acontecem em menos de 1 em cada 1000 casos e estes incluem vômitos, tontura, dor de cabeça e reações alérgicas. Reações mais graves com risco de vida são extremamente raras mas já foram reportadas.

Como de rotina nos iremos respeitar as contra indicações ao exame de ressonância magnética, como: marca-passos cardíacos, clips metálicos no cérebro, claustrofobia e doenças no rim.

O seu tratamento em nada será modificado durante a internação hospitalar ou após a alta médica. Esta pesquisa não lhe acarretará nenhum outro risco ou ônus além dos já ditos. O Sr(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre o andamento da pesquisa, assim como ao pesquisador para esclarecer eventuais dúvidas que possam surgir. Nesse caso, deverá entrar em contato com o **Prof Dr Otávio Rizzi Coelho (pesquisador responsável) pelo telefone (19 – 3521-7554)**. A sua participação é voluntária e o Sr.(a) tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e não permitir mais que seu prontuário faça parte do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade da assistência médica designada para seu tratamento. As informações que forem obtidas serão confidenciais, sendo utilizadas apenas para fins de pesquisa.

Consentimento pós – esclarecido: Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo investigador e ter entendido o que me foi explicado, consinto participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Qualquer dúvida ou esclarecimento entrar em contato com Prof Dr Otávio Rizzi Coelho pelos seguintes contatos:

Telefone: 19 – 3521-7554 e-mail: tavicoelho@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP - Telefone: (19) 3521 8936

Campinas, _____ de _____ de 201__

Assinatura do sujeito da pesquisa () ou responsável legal ().

Assinatura do pesquisador